ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Кафедра терапевтической стоматологии

Допущен к защите

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_­­­­\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ д.м.н., доцент Ермолаева Л.А.

«\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2016 г.

**Выпускная квалификационная работа**

на тему: оценка антибиотикочувствительности микробиоты пародонтальных карманов у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта

Выполнила:

студентка 522 группы

Нестерова М.И.

Научный руководитель: к.м.н. Михайлова Е.С.

Научный руководитель:

к.б.н. Королева И.В.

Санкт-Петербург

2016 год

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

**Перечень условных обозначений**…………………………………………...4

**Введение**

Актуальность………………………………………………………………..5

Цель и задачи исследования………………………………………………..6

Научная новизна работы…………………………………………………...7

Практическая значимость работы…………………………………………7

**Глава 1**. **Литературный обзор**

* 1. Этиология и патогенез воспалительных заболеваний пародонта…...8
  2. Микробиота полости рта и воспалительные заболевания

пародонта……………………………………………………………….18

* + 1. Нормальная микробиота полости рта……………………….…18
    2. Микробиота пародонтального кармана при хроническом генерализованном пародонтите…………………………………..19
    3. Вирулентные свойства пародонтопатогенов…..………………22
  1. Антибиотики в комплексном лечении заболеваний пародонта……32

**1.4.** Механизмы устойчивости к антибиотикам…………………………35

**Глава 2**.**Материалы и методы исследования**

* 1. **.** Клиническая характеристика пациентов………....…………………39

**2.2.** Оценка стоматологического статуса пациентов…………………....39

**2.3.** Микробиологические и генетические методы исследования

**2.3.1.** Забор материала………………………….………………………45

**2.3.2.** Культуральные среды и условия роста……...…………………45

**2.3.3.** Выделение чистой культуры……………………………………45

**2.3.4.** Выделение тотальной ДНК из исходного биологического

материала……………………………………………….………..46

**2.3.5.** Конструирование олигонуклеотидных праймеров…….…..….46

**2.3.6.** Полимеразная цепная реакция………………………………….47

**2.3.7.** Электрофорез и выделение ДНК из агарозного геля,

определение концентрации ДНК…………………………….…48

**2.3.8.** Определение антибиотикочувствительности…………….……49

**Глава 3**. **Результаты исследований**

**3.1.** Результаты клинических исследований………………………..……51

**3.2.** Результаты рентгенологического исследования……………………54

**3.3.** Результаты микробиологических исследований

**3.3.1.** Выделение факультативных анаэробов……………..…………54

**3.3.2.** ПЦР-скрининг на пародонтопатогены…………………………57

**3.3.3.** Идентификация выделенных чистых культур…………………59

**3.4.** Антибиотикочувствительность идентифицированных чистых

культур………………………………………………………………….66

**Глава 4**. **Заключение и выводы**

**4.1.** Заключение……………………………………………………………69

**4.2.** Выводы……………………………………...…………………………71

**4.3.** Практические рекомендации……………...…………………………72

**Список литературы**………………………………...………………………..73

**Приложения**…………………………………………………………………..77

**ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ВЗП – воспалительные заболевания пародонта

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ЛПС - липополисахарид

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ХГП – хронический генерализованный пародонтит

CPITN – Community Periodontal Index of Treatment Needs

OHI–S – Oral Hygiene Indices–Simplified

РМА – папиллярно–маргинально–альвеолярный индекс

**ВВЕДЕНИЕ**

**Актуальность:**

Воспалительные заболевания пародонта (ВЗП) относятся к наиболее распространенной стоматологической патологии.

В мире, согласно данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ, 1997), более 80% населения подвержено ВЗП, которые приводят к потере зубов, появлению в полости рта очагов хронической инфекции, снижению реактивности организма, микробной сенсибилизации, развитию аллергических состояний (Маланьин И.В., Емелина Г.В., Иванов П.В., 2010).

В связи с огромным количеством накопленной информации о роли разных видов микроорганизмов в развитии ВЗП, ВОЗ (1994 - 1995) рекомендовала среди нормальной микробиоты полости рта с анаэробным типом дыхания  выделять так называемые «пародоптопатогенные» виды, отличающиеся от других видов микроорганизмов высокими адгезивными, инвазивными и токсическими свойствами по отношению к тканям пародонта (Царев В.Н. с соавт., 1996; Царев В.Н., 2004).

К «пародонтопатогенным» видам микроорганизмов относят: *Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia, Prevotella intermedia, Treponema denticola, Fusobacterium nucleatum, Actinobacillus actinomycetemcomitans* и др. (Елисеева А.Ф., 2014).

Следовательно, это определяет ряд задач, которые должны быть направлены на выявление и идентификацию пародонтопатогенов, и новые подходы к лечению ВЗП.

Несмотря на усовершенствование методов микробиологической диагностики - использование анаэробной техники культивирования, газовой хроматографии, иммунохимического анализа, проблема этиологической диагностики и лечения ВЗП остается одной из основных в стоматологии.

На сегодняшний день существует необходимость разрабатывать новые методы лечения с дифференцированным применением лекарственных средств, так как имеются трудности в подборе эффективного антибактериального препарата (Царев В.Н., Ушаков Р.В., 2006). Это связано с тем, что интенсивное и неконтролируемое применение химиопрепаратов привело к формированию и распространению множества штаммов микроорганизмов резистентных к антибактериальному лечению. Поэтому в настоящее время для осуществления и совершенствования комплексного персонализированного лечения ВЗП актуальным является определение чувствительности микробиоты пародонтальных карманов к антибиотикам.

Исследование микробиоты пародонтальных карманов позволяет диагностировать ВЗП, прогнозировать дальнейшее развитие заболевания, контролировать эффективность лечебных мероприятий и подбирать наиболее эффективную антибактериальную терапию.

Таким образом, оценка антибиотикочувствительности микробиоты пародонтальных карманов с помощью микробиологических методов исследования позволит подобрать наиболее эффективные антибактериальные препараты для лечения ВЗП и составить рекомендации по их использованию.

**Цель исследования:**

Определение антибиотикочувствительности микробиоты пародонтальных карманов у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) легкой степени тяжести.

**Задачи исследования:**

1**.** Изучить количественный и качественный состав микробиоты пародонтальных карманов у пациентов с ХГП легкой степени тяжести;

2. Провести анализ антибиотикочувствительности микробиоты пародонтальных карманов у пациентов с ХГП легкой степени тяжести;

3. На основании клинико-микробиологических данных сформулировать рекомендации по применению антибактериальных препаратов у пациентов с ХГП легкой степени тяжести.

**Научная новизна работы:**

Проведена оценка антибиотикочувствительности выделенных чистых культур микробиоты пародонтальных карманов пациентов с ХГП легкой степени тяжести. С помощью масс-спектрометрии идентифицированы культуры - *Streptococcus gordonii, Streptococcus anginosus, Streptococcus sanguinis, Streptococcus oralis, Neisseria perflava, Rothia mucilaginosa.* Проведено секвенирование и идентифицированы культуры - *Rothia mucilaginosa, Streptococcus mitis, Streptococcus oralis.* Проведен ПЦР – скрининг на пародонтопатогены и определены *Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Prevotella intermedia.*

**Практическая значимость работы:**

Использование антибиотиков из группы бета-лактамов, макролидов и фторхинолонов, обладающих выраженной активностью в отношении наиболее часто встречающихся видов бактерий, вызывающих ВЗП, позволяет рекомендовать их в качестве эффективных средств комбинированного лечения ХГП легкой степени тяжести.

**ГЛАВА 1. Литературный обзор**

* 1. **Этиология и патогенез воспалительных заболеваний пародонта**

Воспалительные заболевания пародонта – гингивит и пародонтит - являются одной из наиболее актуальных и изучаемых проблем в стоматологии.

Согласно формулировке Л.М. Цепова: «Хронический генерализованный пародонтит можно рассматривать как заболевание возникающее под влиянием неблагоприятного воздействия внешних и внутренних, общих и местных факторов, инфекционно-индуцирующих иммунным повреждением пародонтальный комплекс с большой вероятностью генетической предрасположенности, т.е. являющееся результатом нарушения равновесия между факторами агрессии (пародонтопатогенами) и факторами защиты макроорганизма, полости рта и пародонтального комплекса, протекающего с инициальным поражением десны (гингивит) и последующим вовлечением в патологический процесс всех структур пародонта (пародонтит), характеризующегося прогрессирующим течением с исходом в резорбцию костной ткани, альвеолярного отростка, разрушением удерживающего аппарата зуба, появлением подвижности последнего, образованием пародонтального кармана и заканчивается выпадением или удалением зуба и несомненным нарушением функции зубочелюстной системы и организма в целом».

По данным А.И. Грудянова и Г.М. Барера лишь 12% населения имеют здоровые ткани пародонта, у 53% отмечены начальные воспалительные явления, у 23% - начальные деструктивные явления, а у 12% - поражения средней и тяжелой степени. По данным ВОЗ (1990), среди группы лиц 35 – 44 лет уровень заболеваемости ВЗП достигает 65 - 98 % (Боровский Е.В., 2004). В России, по результатам второго национального эпидемиологического обследования населения в 47 регионах Российской Федерации, уровень заболеваемости ВЗП составляет 82 % (Дмитриева Л.А., 2013). С симптомами заболеваний пародонта нередко обращаются подростки и молодые люди до 30 лет (Пашкова Г.С., Вавилова Т.П., Журули Н.Б., Пашков К.А., 2007).

Высокий уровень заболеваемости, сложность и длительность лечения, значительная частота рецидивов обусловливают центральное место этой патологии в работе не только врача пародонтолога, но и стоматолога общей практики (Безрукова И.В., 2001; Цепов Л.М., 2006; Захаркин А.Г., 2012).

На развитие патологии тканей пародонта как напрямую, так и косвенно воздействует большое количество факторов. Их условно делят на местные и общие.

Местные факторы:

* зубная бляшка, зубной налет, зубной камень;
* состав и свойства слюны;
* бактериальное влияние на ткани пародонта;
* травматическая окклюзия;
* нарушение межзубных контактов;
* патология прикуса;
* скученность зубов;
* кариес;
* короткие уздечки языка и губ, нарушение прикрепления уздечек и тяжей, мелкое преддверия рта;
* некачественно изготовленные пломбы, вкладки, коронки;
* перегрузка тканей пародонта из-за измененных функций жевания и глотания вследствие потери части зубов, заболеваний височно -нижнечелюстного сустава (ВНЧС);
* травма кламмерами съемных протезов, некачественно изготовленными мостовидными протезами;

Общие факторы:

* гипо-, авитаминозы;
* защитная иммунная реакция макроорганизма;
* генетическая предрасположенность (тонкая малокератинизированная десна, малая толщина альвеолярной кости и др.);
* курение;
* атеросклероз сосудов;
* эндокринная патология (сахарный диабет);
* заболевания ЖКТ;
* заболевания системы крови;
* хронические стрессы и др.

Все вышеперечисленные факторы нарушают защитную систему пародонта и создают условия для осуществления патогенного влияния микробиоты на ткани пародонта и прежде всего на зубодесневое прикрепление, воспаление и деструкция которого приводят к формированию пародонтального кармана и развитию пародонтита (Орехова Л. Ю., 2004, Мюллер Х. П., 2004).

Реализация действия патогенных факторов происходит только в том случае, если они по силе превосходят защитные возможности пародонта и при снижении реактивности организма (Данилевский Н.Ф., Борисенко А.В., 2000).

Этиология и патогенез пародонтита еще до конца не изучены. Основной концепцией развития пародонтита в ХХ веке служила «неспецифическая бляшечная» гипотеза, выдвинутая Walter Loesche в 1976 году. По мнению ученых, поддерживающих данную гипотезу, все бактерии бляшки в одинаковой степени могут быть возбудителями заболевания (А. И. Грудянов, 2009). Оно развивается, когда количество микроорганизмов в бляшке достигает определенного уровня, и организм не может противостоять патологическим процессам, потенцируемых воздействием токсических продуктов бактерий. Но данная гипотеза имеет несколько достаточно спорных моментов, которые заключаются в том, что обилие зубного налета приводит к развитию гингивита, но далеко не у всех людей данное состояние переходит в пародонтит, а если прогрессирует до него, то непораженные участки соседствуют с пораженными несмотря на одинаковый патогенный потенциал бляшки (Ричард Дж.Ламонт, Мэрилин С.Лантц, 2010).

В середине 1970-х годов была сформулирована гипотеза, согласно которой не все бактерии приводят к деструкции пародонта, а только обладающие специфическим патогенным потенциалом для инициирования заболевания. Данная гипотеза получила название «специфической бляшечной». Она также была выдвинута Walter Loesche на основании методов выделения конкретных микроорганизмов в составе зубного налета. Например, выделение *Actinobacillus actinomycetemcomitans* послужило основанием для утверждения ее этиологической роли в генезе очагового ювенильного пародонтита (Грудянов А.И., 2009). Исследователи занимались поиском специфических микроорганизмов и выясняли причины их роста. В ходе экспериментов было выяснено, что к возбудителям пародонтита относятся преимущественно грамотрицательные и анаэробные виды.

Возбудители, вызывающие пародонтит:

* Грамотрицательные анаэробы - *Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia, Fusobacterium nucleatum, Prevotella intermedia,* *Compylobacter rectus, Treponema denticola* и другие спирохеты полости рта;
* Грамотрицательные факультативные анаэробы - *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Eikenella corrodens;*
* Грамположительные анаэробы - *Eubacterium nodatum, Peptostreptococcus micros, Streptococcus intermedius.*

Редко и в небольшом количестве они также встречаются и у здоровых лиц (Ричард Дж.Ламонт, Мэрилин С.Лантц, 2010).

В последние годы в качестве альтернативы «специфической» гипотезы выдвинута «экологическая» гипотеза, которая предусматривает влияние внешних факторов на экологию биопленки (зубной бляшки). Это значит, что внешние факторы запускают изменение состава постоянной микробиоты биопленки (зубной бляшки) и это в свою очередь приводит к преобладанию патогенных микроорганизмов. Сторонники «экологической» гипотезы придают значение смешанной микробиоте, акцентируя внимание на том, что отдельные представители вряд ли сами по себе могут самостоятельно вызвать сложный процесс, ведущий к воспалению и деструкции тканей пародонта (Ричард Дж.Ламонт, Мэрилин С.Лантц, 2010).

Биопленка представляет собой хорошо организованное, взаимодействующее сообщество микроорганизмов. Более 95 % бактерий живут в биопленках. Микроорганизмы в биопленке ведут себя иначе, чем бактерии выращенные в культурной среде классическим способом. Фундаментальным в биопленке является взаимодействующая общность различных видов микроорганизмов и агрегация микроорганизмов в микроколонии. Каждой микроколонии свойственна своя особенная микросреда, которая отличается уровнем рН, концентрацией кислорода, усваиваемостью питательных веществ. Внутри биопленки микроорганизмы «обмениваются информацией» при помощи выработки и восприятия химических веществ – раздражителей, которые в свою очередь и определяют степень выделения бактериями потенциально патогенных белков и ферментов (Царев В.И., 2008).

Каждая микроколония в биопленке окружена матриксом, который служит ей защитным барьером. Этим, вероятно, можно объяснить, почему применяемые для лечения антимикробные средства, как общего, так и местного действия зачастую не дают положительных результатов, даже если нацелены на определенный вид микроорганизма. Поэтому механическое удаление бляшек и личная гигиена полости рта остаются неотъемлемой частью лечения воспалительных заболеваний пародонта (Царев В.И., 2008; Клюшникова М. О., Клюшникова О. Н., 2013).

Проведенное экологическое исследование выявило пять бактериальных комплексов: «красный», «зеленый», «желтый», «пурпурный» и «оранжевый». Эти комплексы состоят из бактерий, связанных друг с другом в биопленке (зубной бляшке) (Люговская А.В., Юдина Н.А., 2009).

* «Красный комплекс», обладающий наивысшим патогенным потенциалом, связан с образованием глубоких кровоточащих десневых карманов. В него входят – *Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia,* *Treponema denticola;*
* «Зеленый комплекс» является причиной, как заболеваний пародонта, так и других поражений слизистой оболочки рта и твердых тканей зубов. В него входят – *Actinobacillus actinomycetemcomitans,* *Eikenella corrodens,* *Capnocytophaga spp*;
* «Желтый комплекс» – *Streptococcus sanguis, Streptococcus mitis, Streptococcus israilis;*
* «Пурпурный комплекс» - *Veilonella parvula, Actinomyces odontolyticus;*
* «Оранжевый комплекс» - *Prevotella nigrescen, Peptostreptococcus micros, Compylobacter rectus, Prevotella intermedia* и *Campylobacter spp.*

Последние три комплекса тоже способны вызывать поражение тканей пародонта и другие заболевания слизистой оболочки рта.

Биологической основой бактериальных комплексов являются метаболические и сигнальные взаимодействия между бактериями или их общая стимуляция под действием внешних факторов (Грудянов А.И., 2009; Ричард Дж.Ламонт, Мэрилин С.Лантц, 2010).

В 1985 г. создана теория «оппортунистической инфекции». Согласно данной теории, находящиеся в зубном налете микроорганизмы развиваются под экзогенным или эндогенным влиянием и вытесняют другие бактерии. Оппортунистическая инфекция, зависит не только от присутствия патогенных бактерий, но и от среды способствующей их размножению (локальные изменения рН, анаэробная ниша, изменения резистентности организма и др.) (Лабинская А.С., 2008; Ричард Дж.Ламонт, Мэрилин С. Лантц, 2010).

Патогенез пародонтита во многом обусловлен неспецифической защитой, специфическими иммунологическими процессами, действием медиаторов воспаления. При воспалении в тканях пародонта повышается проницаемость сосудов, увеличивается поток сулькулярной жидкости, усиливается миграция полиморфоядерных лейкоцитов. Они фагоцитируют бактерии, продукты распада тканей и разрушают их своими лизосомальными ферментами. Из клеточных мембран, активизированных полиморфоядерными лейкоцитами, микроорганизмами, выделяется: арахидоновая кислота, тромбоксаны и простагландины. Эта группа веществ играет важную роль в запуске воспаления, регуляции просвета и проницаемости кровеносных сосудов.

Неспецифическая защитная реакция влияет не на все антигенные субстанции (наиболее выраженными антигенными свойствами обладают мукопептиды клеточной оболочки грамположительных и липосахариды грамотрицательных бактерий зубной бляшки), поэтому часто дополнительно активируется специфическая система иммунной защиты, которую разделяют на гуморальную и клеточную системы.

За гуморальный иммунный ответ ответственны В-лимфоциты. Некоторые из них при первом контакте с антигеном трансформируются в плазматические клетки и начинают вырабатывать специфические для данного антигена иммуноглобулины (Ig). С тканями пародонта связаны преимущественно три класса иммуноглобулинов: IgG, IgM, IgA:

1. IgG активируют систему комплемента;
2. IgM способен нейтрализовать инородные частицы, вызывать агглютинацию и лизис клеток;
3. IgA замедляет прикрепление бактерий к эпителию полости рта и предотвращает проникновение микроорганизмов в ткани.

В результате реакции иммуноглобулинов классов IgG и IgM с антигеном образуются комплексы «антиген-антитело», которые могут активировать систему комплемента. Ее активация иммунным комплексом вызывает каскад взаимодействия протеинов. Промежуточные или окончательные продукты этого взаимодействия могут повышать проницаемость сосудов, вызывать хемотаксис полиморфоядерных лейкоцитов, способствовать опсонизации и фагоцитозу бактерий и др.

За клеточный иммунный ответ ответственны Т-лимфоциты. После активации антигеном они пролиферируют и превращаются в Т-эффекторы или в долгоживущие Т-клетки памяти.

Патогенные микроорганизмы зубной бляшки и пародонтального кармана вызывают сенсибилизацию тканей пародонта. Это усиливает альтерацию тканей и может привести к образованию тканевых аутоантигенов, на которые иммунная система реагирует по-разному. В одних случаях развивается защитный, не нарушающий гомеостаз, иммунный ответ, сохраняющийся до тех пор, пока не нарушится функциональное состояние Т- и В-лимфоцитов. В других случаях, по мере истощения Т-супрессоров в результате хронического воздействия аутоантигенов, начинается активация иммунного ответа на антигены, что и обуславливает клиническую выраженность симптомов и «самодвижущийся» характер пародонтита (Боровский Е.В. и др., 2001).

На течение воспаления в тканях пародонта влияют медиаторы воспалительной реакции: гистамин, серотонин, лимфокины, простагландины, лейкотриены, брадикинин, интерлейкины.

Действие гистамина проявляется уже через несколько секунд после действия флогогенного агента, вследствие чего (после почти мгновенной вазоконструкции) очень быстро развивается вазодилатация и появляется начальная волна возрастания проницаемости микрососудов (действие кратковременно).

В очаге воспаления, в небольших концентрациях серотонин вызывает расширение артериол, сокращение стенок венул и венозный застой.

Большую роль при воспалении играют производные арахидоновой кислоты — простагландины и лейкотриены.

При пародонтите повышена активность простагландина Е2, который стимулирует активность остеокластов, вызывает вазодилатацию и повышение проницаемости микрососудов.

Лейкотриены повышают проницаемость кровеносных сосудов и вызывают приток и активацию лейкоцитов.

Брадикинин образуется в плазме в результате расщепления кининогена калликреин ( повышает проницаемость сосудов, обуславливает появление отечности, гиперемии, боли).

Интерлейкины — иммунорегуляторные протеины. Интерлейкин-1 стимулирует активность остеокластов, интерлейкин-2 необходим для пролиферации Т-клеток и других процессов, регулирующих иммунный ответ. (Иванов, 1998).

Следовательно, выделяемые экзотоксины и эндотоксины нарушают клеточный обмен, вызывают альтерацию тканей пародонта, что в свою очередь способствует развитию воспалительной реакции.

Развитие, течение воспалительного процесса, его генерализация и переход в хроническую форму, определяются состоянием защитных сил самого организма и ответной реакцией иммунной системы.

* 1. **Микробиота полости рта и воспалительные заболевания пародонта**

"Ротовую полость человека населяет более 700 видов бактерий. Большинство из них являются безвредными и выполняют полезные функции поддержания здоровой микрофлоры в ротовой полости человека. Однако некоторые виды бактерий являются «пародонтопатогенными бактериями» или маркерными микроорганизмами. Целенаправленная борьба с этими бактериями имеет ключевое значение для достижения долгосрочного положительного эффекта терапии" (Ричард Дж. Ламонт, Мэрилин С. Лантц, 2010).

* + 1. ***Нормальная микробиота полости рта***

В полости рта присутствуют транзитные микроорганизмы, попадающие из воздуха, из воды или с пищей, находящиеся ограниченное время и резидентная (постоянная) микрофлора, образующая стабильную экосистему. Слизистая оболочка рта является местом обитания ряда сапрофитных микроорганизмов, которые между собой находятся в состоянии динамического равновесия, сложившегося в процессе длительной эволюции, и поддерживаемого факторами иммунитета, обеспечивающими гомеостаз. В сложившейся экосистеме могут происходить небольшие изменения, зависящие от времени суток, сезонности и т. д., но изменяется только количество представителей нескольких видов, а видовое представительство у каждого конкретного человека остается постоянным на протяжении длительного периода времени или всей жизни (Боровский Е.В., Леонтьев В.К., 2001; Зеленова Е.Г., Заславская М.И., 2004; Дмитриева Л.А., 2007).

В полости рта, представляющей собой экологическую нишу, выделяют несколько биотопов различающихся между собой условиями обитания:

* слизистая оболочка рта;
* протоки слюнных желез и находящаяся в них слюна;
* десневая жидкость и десневой желобок;
* ротовая жидкость;
* зубная бляшка.

Для каждого биотопа характерен свой видовой состав микроорганизмов (Боровский Е.В., Леонтьев В.К., 2001).

Десневой желобок формируется за счет десны, непосредственно окружающей зуб. В нем содержится десневая жидкость, представляющая собой транссудат, который секретируется в области десневого желобка и сразу контаминируется микрофлорой слизистой десны и ротовой жидкости (Царев В.И., 2008).

В десневом желобке преобладают нитевидные и извитые облигатно-анаэробные виды бактерий: фузобактерии, лептотрихии, актиномицеты, спириллы, анаэробовибрио, кампилобактер и спирохеты, есть группы бактероидов *Bacteroides, Porphyromonas и Prevotella*, простейших, дрожжеподобных грибов (Боровский Е.В., 2001).

У здорового человека концентрация бактерий в десневой жидкости не превышает 100 тысяч клеток в мл. При пародонтите концентрация вышеперечисленных микроорганизмов значительно увеличивается (Царев В.И., 2008).

* + 1. ***Микробиота пародонтального кармана при хроническом генерализованном пародонтите***

За последние десятилетия было проведено множество исследований, направленных на изучение возбудителей пародонтита. Это было достаточно сложно, так как классические критерии триады Коха для определения микроорганизма далеко не во всех случаях могли применяться, что объясняется следующими причинами:

* некоторые бактерии трудно культивировать (например, спирохеты);
* изучаемые возбудители встречаются в микробиоте здоровых людей;
* подходящая модель для развития пародонтита на животных отсутствует. (Ричард Дж.Ламонт, Мэрилин С.Лантц, 2010).

Поэтому для идентификации микроорганизмов, вызывающих пародонтит были разработаны следующие критерии:

* связь заболевания и повышенного содержания предполагаемого возбудителя в очаге поражения;
* клиническое улучшение в результате снижения численности возбудителя;
* наличие признаков иммунного ответа организма на антигены возбудителя;
* наличие у возбудителя патогенности, подтверждаемой на экспериментальных животных;
* наличие факторов вирулентности, которые могут вызывать деструкцию тканей пародонта (Ричард Дж.Ламонт, Мэрилин С.Лантц, 2010).

Понятие «пародонтопатогенная микрофлора» обосновано рядом экспериментов, включающих в себя непосредственный поиск возбудителей заболевания, роли микробных токсинов в развитии патологических процессов в пародонте, сравнение здоровых и пораженных тканей (Ричард Дж.Ламонт, Мэрилин С.Лантц, 2010). Особенно убедительны опыты на гнобиотах, показывающие, что без микроорганизмов нет пародонтита (Артюшевич А.С., 2002).

На основании большинства микробиологических исследований установлено, что у больных пародонтитом преобладают грамотрицательные анаэробные палочки (Ричард Дж.Ламонт, Мэрилин С.Лантц, 2010).

К основным пародонтопатогенам в настоящее время принято относить *Porphyromonas gingivalis* и *Prevotella intermedia*. Одной из особенностей развития пародонтита является наличие как пародонтопатогенной, так и стабилизирующей микрофлоры. Пародонтопатогены в здоровых деснах практически не определяются, за исключением единичных случаев. К пародонтопатогенам относят: *Porphyromonas gingivalis; Prevotella intermedia; Tannerella forsythia; Actinobacillus actinomycetemcomitans; Treponema denticola; Fusobacterium spp.; Actinomyces spp.; Streptococcus intermedius; Сandida spp.*(Григорян А.С., 2007).

К стабилизирующей микрофлоре относятся микроорганизмы, населяющие здоровые ткани в значительном количестве, и входящие в нормальный биоценоз десневого желобка. При условии изменения экологических условий стабилизирующая микрофлора начинает проявлять свои патогенные свойства. Стабилизирующие микроорганизмы присутствуют в небольшом количестве и не всегда, и при превышении определенного количества проявляют деструктивные свойства. На основании многочисленных экспериментов было установлено, что к ним можно отнести следующие виды микроорганизмов: *Veillonella spp.; Streptococcus sanguis; Streptococcus salivarius; Streptococcus mutans; Streptococcus milleri; Peptostreptococcus spp;. Corinebacteriura spp.; Propionibacterium spp.; Lactobacillus spp.;* *Haemophilus spp.; Enterococcus spp.; Enterobacterium spp.* (Царев В.И., 2008).

* + 1. ***Вирулентные свойства пародонтопатогенов***

Вирулентность потенциальных возбудителей пародонтита обусловлена рядом факторов, действие которых часто бывает разнонаправленным, особенно в отношении врожденного иммунитета. Наличие у бактерий таких свойств согласуется с «экологической» гипотезой, в соответствии с которой одни и те же бактерии могут обитать как в здоровых, так и в пораженных тканях, и разные условия обитания в тоже время могут индуцировать у этих бактерий разные фенотипические свойства (Ричард Дж.Ламонт, Мэрилин С.Лантц, 2010).

Для данной работы наибольший интерес представляют 4 микроорганизма: *Porphyromonas gingivalis, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Prevotella intermedia, Tannerella forsythiа,* так как именно эти микроорганизмы своими факторами вирулентности способствуют развитию пародонтита*.* Согласно литературным данным эти микроорганизмы наиболее часто встречаются у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом (Царев В.И., 2008).

* *Porphyromonas gingivalis* – это неподвижные грамотрицательные анаэробные палочки. Из предполагаемых возбудителей они наиболее тесно связаны с хроническим пародонтитом. Обнаружение этого организма указывает на риск прогрессирования пародонтита, а удачное лечение коррелирует со снижением числа этих микроорганизмов в тканях.
* Молекулы и структуры:

1. Протеазы

Основная функция протеаз – обеспечение растущих клеток пептидами. Но так как они разрушают белки организма – хозяина, то могут ослаблять его защитные механизмы. Поэтому этим молекулам приписывают роль основных факторов вирулентности.

В настоящее время стали известны генетические последовательности, отвечающие за синтез данных ферментов.

Наиболее подробно описаны аргинин- и лизинспецифические цистеиновые протеиназы - гингипаин R и гингипаин К, которые обладают адгезивной и гемагглютинирующей активностью.

Также имеется другая группа цистеиновых протеиназ - стрептопаинподобная протеаза, пародонтаин, расщепляющий и инактивирующий ингибитор а1-протеиназы. Данные протеиназы обладают гемагглютинирующей активностью.

На поверхности бактериальной клетки имеется Pz-пептидаза, которая не действует на нативный коллаген, но может расщеплять желатин и Pz-пептид, что обуславливает их роль в разрушении коллагена зубодесневого прикрепления в пародонте.

Другие протеиназы включают аминопептидазы, эндотелин-превращающий фермент, подобный эндопептидазе, и пролилдипептидилпептидазу IV.

Основными функциями протеиназ является нарушение целостности тканей в результате разрушения белков внеклеточного матрикса - фибронектина и ламитина, гидролиза коллагенов, разрушения фибриногена и активации калликреин-кининовой системы; повреждение защитных механизмов макроорганизма с помощью разрушения иммуноглобулинов, инактивации системы комплемента, деструкции цитокинов и поверхностных рецепторов лейкоцитов. В ходе этих механизмов бактерия получает гемины и ионы железа от организма-хозяина.

1. Гемагглютинины

Поверхностные гемагглютинины обеспечивают связь бактерий с рецепторами клеток организма – хозяина и последующую их колонизацию. Гемагглютинирующая активность бактерии связана с фимбриями, липополисахаридом (ЛПС) и липидом на поверхности клетки, соответствующими доменами протеаз и такими белками, как HagA, HagB и HagC. Последние участвуют в прикреплении бактерии к клеткам организма – хозяина, например эпителиальным клеткам или эритроцитам.

1. Липополисахариды (ЛПС)

Липополисахариды *Porphyromonas gingivalis* не содержат гептозы или содержат очень мало, жирные кислоты этой бактерии более длинные и разветвленные. У этой бактерии низкая эндотоксичность в отличии от липополисахаридов других микроорганизмов.

1. Фимбрии

Поверхность бактерии покрыта длинными и короткими перитрихиальными фимбриями. Длинные фимбрии обеспечивают гомологию с фимбриями бактерий других видов. Короткие фимбрии встречаются значительно реже. В опытах была показана роль фимбрий в адгезии, колонизации и деструкции пародонта. Отмечена важная роль фимбрий в развитии инфекционного процесса.

1. Пузырьки наружной мембраны

Связанные с поверхностью бактерий пузырьки образуются путем выпячивания наружной мембраны и поэтому содержат ее структуры, а также захваченные компоненты периплазмы. Пузырьки способствуют связыванию *Porphyromonas gingivalis* с эритроцитами, другими бактериями и поверхностью гидроксиапатита. Также показана их способность агрегировать тромбоциты. Имеются предположения, что адгезивные микропузырьки являются средством адресной доставки факторов вирулентности, так как их малый размер позволяет проникать в места недоступные для клеток.

1. Полисахаридная капсула

У этой бактерии различают шесть серотипов капсул. Полисахаридный слой на поверхности этих микроорганизмов может маскировать ЛПС и таким образом изменять его активность.

* Механизмы вирулентности:

*Porphyromonas gingivalis* необходимо прикрепиться к субстрату, что обеспечивается фимбриями, которые связываются с эпителиальными клетками, компонентами клеточного матрикса, компонентами слюны и гидроксиапатитом для последующей колонизации. Далее *Porphyromonas gingivalis* преодолевает эпителиальный барьер, путем внедрения микроорганизма через поврежденную сигнальную систему клетки, подавляет транскрипцию и секрецию нейтрофилами ИЛ-8, помимо этого разрушаются компоненты плотного межклеточного контакта, что способствует проникновению в более глубокие слои. Протеолитические ферменты бактерии разрушают различные белки организма-хозяина и нарушают функции. В ответ на агрессию организм формирует воспалительный ответ, но он может быть подавлен компонентами бактериальной клетки.

*Porphyromonas gingivalis* может стимулировать деструкцию костной ткани, подавление ее регенерации в результате нарушения равновесия остеобластов и остеокластов, ЛПС способствуют высвобождению из фибробластов, макрофагов и моноцитов медиаторов костной резорбции ИЛ-1, простогландина Е2, ФНО-α. Эти медиаторы провоцируют выработку протеаз организма-хозяина для разрушения костной ткани(Ричард Дж. Ламонт, Мэрилин С. Лантц, 2010).

* *Actinobacillus actinomycetemcommitans* – неподвижные грамотрицательные факультативно – анаэробные палочки.
* Молекулы и структуры:

1. Лейкотоксин

Лейкотоксин имеет связь с периодонтом лунки зуба и способствует раннему выпадению зубов. Лейкотоксин относится к порообразующим гемолизинам, то есть связываясь с моноцитами, нейтрофилами и лимфоцитами, он образует поры в их мембранах. Гибель клетки происходит в результате апоптоза и осмотического шока.

1. Цитотоксины

CTD - токсин летального набухания клетки. Он обеспечивает перестройку жизненного цикла эукариотических клеток, актина, ускоряет процессы апоптоза.

ISF - фактор иммуносупрессии, вызывает задержку подготовки клетки к митозу у В-клеток и лимфоцитов.

Лейкотоксин и клетки возбудителя CTD индуцируют апоптоз иммуноцитов, нарушая иммунологический надзор.

1. Липополисахариды (ЛПС)

У этих микроорганизмов ЛПС вызывает лизис костной ткани, склеивание тромбоцитов и эритроцитов, некроз кожи. Под воздействием этого фактора активируются макрофаги, стимулируется выброс ими ИЛ-1α, ИЛ-1β, ФНО (фактор некроза опухоли) и другие цитокины.

1. Белки, связывающие Fc-фрагмент антител

Бактериальные Fc-фрагменты - белки, связывающиеся с иммуноглобулинами, тем самым занимая рецепторный белок для нейтрофила, который активирует фагоцитоз. Fc-фрагменты у микроорганизмов также способны подавлять систему комплемента. Блокирование этих двух важных иммунных процессов, значительно подавляет защитные силы макроорганизма.

1. Мембранные пузырьки
2. Внеклеточный аморфный материал

Внеклеточный аморфный материал в виде матрикса окутывает клетки и обладает адгезивной и костнорезорбтивной активностью.

g) Фимбрии

Фимбрии этой бактерии расположены перитрихиально, имеют длину около 2 мкм и диаметр 5 нм, часто формируют пучки. Фимбрии способствуют адгезии к клеткам эпителия и гидроксиапатиту эмали.

* Механизмы вирулентности:

1. Адгезия

*Actinobacillus actinomycetemcommitans* колонизирует эпителий десневой борозды за счет адгезии к поверхности зубов и слизистой оболочке, которая осуществляется фимбриями, мембранными пузырьками, внеклеточным аморфным материалом и адгезивными белками на поверхности микробной стенки. Колонизирование соединительной ткани полости рта и других участков организма осуществляется за счёт связывания с компонентами внеклеточного матрикса (фибронектин, ламинин, волокнообразующие коллагены и белки базальной мембраны).

1. Проникновение в эпителиальные клетки

*Actinobacillus actinomycetemcommitans* прикрепляется к клеткам организма - хозяина, что приводит к образованию вакуоли. Микроорганизм проникает внутрь клетки макроорганизма и быстро разрушается, что позволяет бактериям поступить в цитоплазму. Бактерии связываются с микротрубочками и перемещаются как внутри клетки, так и в соседние клетки. Такой процесс внутри и межклеточного распространения микроорганизмов в тканях десны вызывает деструкцию пародонта.

1. Вариабельность колоний

На плотной среде бактерии образуют три типа колоний. При первичном посеве из десневой жидкости вырастают шероховатые колонии (прозрачные, округлые, с неровными краями). В жидкой среде клетки формируют агрегаты на стенках сосудов. При повторных посевах образуются два варианта колоний (гладкие прозрачные и гладкие непрозрачные). Шероховатые колонии содержат большее количество фимбриальных белков, клетки гладких колоний мало либо вообще не содержат фимбриальные белки и в связи с этим обладают малой адгезией.

1. Взаимодействие с защитными механизмами организма хозяина

* подавление хемотаксиса фагоцитов;
* нарушение процессов слияния и переваривания в лизосомах;
* устойчивость к действию различных антимикробных факторов нейтрофилов.

1. Резорбция костной ткани

Резорбция костной ткани обеспечивается несколькими факторами, в том числе ассоциированными с поверхностью клетки материалами SAM, ЛПС и фактором микропузырьков. SAM активизирует остеокласты и оказывает антипролиферативное влияние на остеобластоподобные клетки.

1. Апоптоз

Лейкотоксины активизируют каскад биохимических реакций, обеспечивающих апоптоз клеток организма – хозяина (Ричард Дж. Ламонт, Мэрилин С. Лантц, 2010).

* *Prevotella intermedia* - грамотрицательная облигатно – анаэробная бактерия.
* Молекулы и структуры:

1. Фимбрии

У данного микроорганизма различают 4 вида фимбрий. Тип фимбрий зависит от колонии и штамма (с 1 типом фимбрий, с несколькими типами или без них).

1. Гидролазы

Протеазам этой бактерии свойственна гидролитическая, протеолитическая, нуклеолитическая, липолитическая и сахаролитическая активность. Им определяют существенную роль в развитии воспалительного процесса.

1. Гемолизин и гемагглютинин

Пузырьки наружной мембраны обладают гемолитической активностью за счет наличия многокомпонентного гемолизина. *Prevotella intermedia* также может вызвать термолабильную агглютинацию эритроцитов с помощью фимбрий, а термостабильную агглютинацию ЛПС – подобными структурами.

* Механизмы вирулентности:

1. Коагрегация

Коагрегация осуществляется за счет поверхностных белков или гликопротеинов бактерии. Коагрегирует только с отдельными видами *Actinomyces*.

1. Адгезия

*Prevotella intermedia* обладает адгезией к буккальным эпителиальным клеткам за счет наличия фимбрий и, связываясь с коллагенами органической матрицы организма-хозяина, разрушает лактоферрин клеток.

1. Инвазия в эпителиальные клетки

Проникновение *Prevotella intermedia* в эпителиальные клетки связано с наличием фимбрий типа С.

1. Индукция выработки воспалительных цитокинов

ЛПС и поверхностные компоненты бактерии могут индуцировать экспрессию провоспалительных цитокинов. ИЛ-1 вызывает резорбцию костной ткани, ИЛ-8 – хемокин для нейтрофилов, ИЛ-6 – пролиферацию Т- и В- лимфоцитов (Чухловин А.Б., Соловьева А.М., 2007; Ричард Дж.Ламонт, Мэрилин С.Лантц, 2010).

* *Tanerella forsythia* - грамотрицательная анаэробная бактерия из семейства Бактероидов.
* Молекулы:

1. Гидролазы

Бактерия образует трипсиноподобные протеазы – аргининспецифичную цистиновую протеазу, обладающую гемолитической активностью и сиалидазу.

* Механизмы вирулентности:

1. Коагрегация

*Tanerella forsythia* коагрегирует с *Porphyromonas gingivalis* при участии белково - белковых взаимодействий. Этот процесс подавляется сывороткой крови. Также возможна коагрегация со *Streptococcus cristatus*.

1. Адгезия

*Tanerella forsythia* при помощи BspA может прикрепляться к эритроцитам, фибробластам и лейкоцитам (Чухловин А.Б., Соловьева А.М., 2007; Ричард Дж.Ламонт, Мэрилин С.Лантц, 2010).

Таким образом, патогенная микрофлора представляет основную угрозу в развитии и течении пародонтита. Поэтому лечение прежде всего должно быть направлено на снижение или полное исключение воздействия патогенных микроорганизмов.

**1.3. Антибиотики в комплексном лечении заболеваний пародонта**

Антибиотики – это вещества, которые избирательно угнетают жизнедеятельность микроорганизмов. То есть проявляют свою активность только по отношению к микроорганизмам и действуют не на все, а только на определенные виды и роды, и в то же время, не влияя на жизнеспособность клеток хозяина (Ньюман М., Винкельхофф А., 2004; Царев В.Н., Ушаков Р.В., 2006).

Из – за большого разнообразия механизмов колонизации и вирулентных свойств пародонтопатогенов субгингивальной бляшки одних механических и гигиенических мероприятий (удаление над- и поддесневых зубных отложений, тщательный домашний уход) часто бывает недостаточно. Например, *Actinobacillus actinomycetemcommitans* обладает способностью инвазировать ткани пародонта и поэтому может быть устойчив к механическому удалению. Также к механическому удалению устойчивы и другие микроорганизмы, такие как *Prevotella intermedia, Bacteroides forsythus, Peptostreptococcus micros,* обладающие способностью заселять эпителиальные клетки как внутриклеточные паразиты (Царев В.И., Ушаков Р.В., 2004; Дмитриева Л.А., 2007).

Таким образом, учитывая вышесказанное, следует отметить, что в некоторых случаях применение антибиотиков необходимо для подавления стойких субгингивальных патогенов (Дмитриева Л.А., 2007).

Применение антибиотиков показано в следующих случаях:

* при упорном пародонтите (когда механическая обработка и тщательный домашний уход не дают улучшения и продолжается потеря тканей пародонта);
* лицам со сниженной антиинфекционной резистентностью;
* лицам с локализованным ювенильным пародонтитом и при всех формах раннего пародонтита;
* лицам с пародонтитом, развившемся вследствие системного заболевания;
* лицам с острыми и тяжелыми формами инфекций пародонта (периодонтальный абсцесс, острый язвенно-некротический гингивит или пародонтит) (Цепов Л.М., Михеева Е.А., 2008; Ричард Дж.Ламонт, Мэрилин С.Лантц, 2010).

Выбор антибиотика зависит от диагноза, применения антибиотиков данным больным в анамнезе, идентификации предполагаемых возбудителей пародонтита, иногда и от результатов определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам (Грудянов А.И., 2004; Дмитриева Л.А., 2007; Ричард Дж.Ламонт, Мэрилин С.Лантц, 2010).

При лечении пародонтита системно применяют следующие антибиотики:

* Тетрациклины;
* Пенициллины;
* Клиндамицин (линкозамиды);
* Азитромицин (макролиды);
* Метронидазол в комбинации с аугментином или ципрофлоксацином (Царев В.Н., Ушаков Р. В., 2006; Барер Г. М., 2013).

Для лечения пародонтита нет универсального антибиотика или сочетания препаратов. У каждого антибиотика есть свои преимущества и недостатки (Иванов В.С., 1998; Безрукова И.В., Грудянов А.И., 2004; Царев В.Н., Ушаков Р.В., 2004; Ричард Дж.Ламонт, Мэрилин С.Лантц, 2010).

Тетрациклины – антибиотики широкого спектра действия, но представители поддесневой микробиоты часто оказываются устойчивы к ним. Также и пенициллины даже в сочетании с клавулоновой кислотой зачастую не эффективны, так как микроорганизмы, вызывающие пародонтит образуют бета-лактамазы. Клиндамицин подавляет большинство возбудителей пародонтита, но ввиду устойчивости к нему *Eikenella corrodens* и *Actinobacillus actinomycetemcommitans,* перед началом лечения необходимо убедиться в их отсутствии у больного. Метронидазол специфически подавляет рост облигатных анаэробов и эффективен при лечении больных, у которых отсутствует *Actinobacillus actinomycetemcommitans.* Но в сочетании с амоксициллином метронидазол эффективен в отношении *Actinobacillus actinomycetemcommitans* (Ньюман М., 2004; Царев В.Н., Ушаков Р.В., 2004; Дмитриева Л.А., 2007; Ричард Дж.Ламонт, Мэрилин С.Лантц, 2010).

Тетрациклины и метронидазол включают в составы для местного лечения поддесневых участков, не поддающихся механической терапии (Царев. В.Н., 2004; Ричард Дж.Ламонт, Мэрилин С.Лантц, 2010).

Системное применение антибиотиков снижает риск прогрессирования заболевания и повторной колонизации пародонтальных карманов. Это связано с тем, что рост патогенной микробиоты подавляется повсеместно, включая скрытые очаги инфекции. К недостаткам этого способа назначения антибиотиков, по сравнению с местным применением, относятся невозможность достижения высокой концентрации антибиотиков в пародонтальной жидкости, наличие побочных эффектов и формирование полирезистентных штаммов бактерий (Ньюман М., 2004; Грудянов А.И., Овчинникова В.В., Дмитриева Н.А., 2004; Царев В.Н., 2006).

**1.4 Механизмы устойчивости к антибиотикам**

Несмотря на широкий выбор антибиотиков, их «мишени» ограничены важнейшими функциями бактерий - синтезом клеточной стенки, биосинтезом макромолекул (нарушение репликации, транскрипции, трансляции), отдельными этапами метаболизма (нарушение синтеза фолиевой кислоты). Встречаются и другие «точки приложения», такие как разрушение мембраны и повреждение ДНК (Ньюман М., 2004).

За введением в клиническую практику нового антибиотика обязательно следует появление микроорганизмов, устойчивых к нему. Причиной этого может быть: приобретение гена, кодирующего синтез фермента, способного разрушать или инактивировать антибиотик, или позволяющего клетке изменить «мишень» для антибиотика, или мутации в гене, кодирующим или контролирующем экспрессию «мишени», или приобретение/активация хромосомно-детерминируемой эффлюксной помпы, выбрасывающей антибиотик из клетки, препятствуя его контакту с «точкой приложения». Следовательно, у бактерий для каждого антибиотика имеется один, а чаще 2 – 3 механизма преодоления его подавляющей или летальной активности. Гены антибиотикорезистентности являются частью транспозонов или интегронов и могут входить в состав плазмид, хромосом или ДНК бактериофага. Фенотипы антибиотикорезистентности передаются между бактериальными штаммами одного или разных видов при участии плазмид или транспозонов в результате коньюгации, мобилизации коньюгативной плазмидой, трансформации, трансдукции (Вольф Г., Ратейцхак Э., Ратейцхак К., 2008; Ричард Дж.Ламонт, Мэрилин С.Лантц, 2010).

При появлении устойчивости к любому антибиотику такой штамм передаст ее другим штаммам или видам микроорганизмов. Этому способствует правильное и неправильное применение антибиотиков в медицине. Если штамм полирезистентный, то использование любого из антибиотиков, к которому он устойчив, будет способствовать селекции всего фенотипа резистентности (Ричард Дж.Ламонт, Мэрилин С.Лантц, 2010).

В настоящее время у бактерий в полости рта идентифицировано множество детерминант тетрациклиноустойчивости: tet B – y *Actynobacillus actinomycetemcomitans* и *Treponema denticola*; tet L – y *Eikenella corrodens, Neisseria sicca, Fusobacterium nucleatum, Veillonella parvula*; tet Q – y *Prevotella spp., Veillonella parvulla, Capnocytophaga spp*.; tet M – y различных Гр+ и Гр- бактерий.

С конца 1980-х годов у многих Гр+ и Гр- бактерий полости рта выявлена продукция бета-лактамаз. Кроме того, среди «зеленящих» стрептококков и *Streptococcus pneumoniae* посредством естественной трансформации распространяется устойчивость к бета-лактамам, обусловленная ПСБ (пенициллин связывающим белком).

Некоторые бактерии полости рта имеют развившуюся или приобретенную устойчивость почти ко всем клинически значимым антибиотикам. Хотя подавляющее большинство таких бактерий относятся к комменсальным и обычно не связаны с инфекциями, безусловно, они могут и выступают в качестве резервуара генов антибиотикорезистентности. Следовательно, посредством одного или нескольких генетических механизмов они могут передать этот фенотип патогенным микробам, длительно или транзиторно пребывающим в полости рта (Ричард Дж.Ламонт, Мэрилин С.Лантц, 2010).

* По данной теме были проведены следующие исследования:
* «Анализ чувствительности микробных ассоциаций, выделенных у пациентов с пародонтитом, к антибиотикам» (Володина Е.В., Багдасарян В.А., 2014).

В работе изучалась резистентность патогенной микрофлоры при пародонтитах к используемым в стоматологии противомикробным средствам.

По результатам данного исследования к бета-лактамам и линкозаминам была выявлена резистентность в 32-44% случаев. В то же время, к Цефамандолу этот показатель оказался вдвое меньше – 16%. К старым макролидам (Эритромицин и Олеандомицин) резистентность выявлена в 64-72%. К Азитромицину (относительно новый препарат на Российском рынке) – 12%, а к макролидам нового поколения (Рокситромицин и Спирамицин) – 4%. К антибиотикам широкого спектра действия (Доксициклин и Тетрациклин) – 48-52%. К Левомецитину, Грамицидину С, Рифампицину – 4%. К аминогликозидам (Гентамицин и Канамицин) – 88-92%. К Метронидазолу – 20%, к Нитазолу – 16%. В группе фторхинолонов: к Налидиксовой кислоте – 80%, Офлоксацину, Ломефлоксацину, Норфлоксацину – 48-52%, Ципрофлоксацину - 32%.

* «Дифференцированное применение антибиотиков в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита" (Галабуева А.И., 2005).

В данной работе было показано, что «представители пародонтопатогенной микрофлоры пародонтального кармана больных хроническим генерализованным пародонтитом высоко чувствительны к макролидам, линкозамидам, цефалоспоринам».

* "Эффективность комплексного лечения пародонтита с применением антибиотиков по результатам теста индивидуальной чувствительности микрофлоры" (Шарапудинова М.Г., 2009).

Результаты этой работы демонстрируют, что «наибольшую чувствительность выделенная микрофлора показала к ципрофлоксацину (40,4%), к азитромицину (38,3%). Наименьшая чувствительность была продемонстрирована к линкомицину(22,4%)».

«Ступенчатая антибактериальная терапия с применением на второй ступени макролидов и фторхинолонов является эффективным методом системного лечения пародонтита средней степени тяжести в стадии обострения».

«Использование антибиотиков группы макролидов, цефалоспоринов, линкозамидов, обладающих выраженной активностью в отношении пародонтопатогенных видов бактерий и другой смешанной микрофлоры, позволяет рекомендовать их в консервативно-хирургическом лечении хронического генерализованного пародонтита средней степени тяжести».

Таким образом, анализ литературных данных показал, что в развитии ВЗП основная роль принадлежит «пародонтопатогенным» видам микрооргнанизмов, которые обладают высокими адгезивными, инвазивными и токсическими свойствами по отношению к тканям пародонта; у микроорганизмов имеется множество механизмов развития устойчивости к большинству используемым в лечении антибиотикам; часто микроорганизмы имеют 2-3 механизма устойчивости, в связи с этим развивается полирезистентность; поэтому необходимость изучения антибиотикочувствительности микроорганизмов, вызывающих ВЗП, является одной из актуальных проблем на сегодняшний день.

**ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования**

**2.1 Клиническая характеристика пациентов**

В соответствии с поставленными задачами было проведено обследование 7 пациентов (4 женщин и 3 мужчин) в возрасте от 35 до 54 лет (средний возраст составил 46 лет) с ХГП легкой степени тяжести без тяжелой сопутствующей патологии.

Критерии включения пациентов в исследование: достоверный диагноз хронического генерализованного пародонтита; информированное согласие больного.

Критерии исключения пациентов из исследования: курильщики; наличие ортодонтических аппаратов; тяжелая сопутствующая патология внутренних органов с функциональной недостаточностью, сахарный диабет, опухоли любой локализации; ВИЧ-инфекция, активный туберкулез; отказ больного от обследования.

Всем пациентам было проведено обследование, предусматривающее оценку стоматологического статуса, с занесением полученных данных в карту обследования стоматологического пациента (Приложение 1).

**2.2 Оценка стоматологического статуса пациентов**

Клиническое обследование пациентов было проведено по общепринятой методике, которая включала сбор анамнеза, внешний осмотр и осмотр полости рта. При этом определяли интенсивность кариеса постоянных зубов, уровень гигиены полости рта, состояние тканей пародонта. Использован комплекс основных и дополнительных методов исследования.

* Программа обследования пациента:
* сбор анамнеза жизни и заболевания;
* клинический осмотр (зубная формула, состояние прикуса, уздечек верхней и нижней губ, тяжей слизистой оболочки рта, цвет слизистой оболочки десны);
* интенсивность кариеса оценивали по методике, рекомендованной ВОЗ, путём подсчёта индекса КПУ зубов (Klein, 1938). Данный индекс основан на подсчете количества кариозных (К), пломбированных (П) и удаленных (У) зубов;
* наличие мягкого зубного налета, наддесневых и поддесневых отложений;
* характер экссудата из пародонтального кармана;
* оценка ортопантомограмм и компьютерной томографии;
* оценка подвижности зубов по степени их смещения по шкале Miller в модификации Fleszar (1980):

0 - зуб устойчив, подвижность находится в пределах физиологической;

1-я степень - зуб смещается относительно оси, но смещение не превышает 1мм;

2-я степень - зуб смещается на 1-2мм в щечно-язычном направлении, при этом функция его не нарушена;

3-я степень - подвижность резко выражена, зуб подвижен не только в щечно-язычном направлении, но и по вертикали, функция его нарушена;

* определение клинической потери прикрепления (КПП) - расстояния между границей эмаль/цемент и клинически зондируемым дном пародонтального кармана.

Необходимо отметить, что фактическое дно кармана или борозды невозможно определить зондом, так как при воспалении десны зонд всегда проходит сквозь соединительный эпителий; при давлении 2 МПа зонд уже достигает соединительной ткани.

При легкой степени тяжести ХГП потеря составляет 1-2 мм, при средней – 3-4 мм, при тяжелой – 5 мм и более;

* определение стоматологических индексов:

1. Индекс гигиены Силнес-Лоу (Silness, Loe, 1964)

Используется для определения толщины зубного налета. Обследуются 11, 16, 24, 31, 36, 44, могут быть осмотрены все зубы или по желанию исследователя. Исследуются 4 поверхности зуба: вестибулярная, оральная, дистальная, медиальная; при этом выявляют налет в придесневой области. Наличие налета определяется визуально или с помощью зонда без окрашивания. После высушивания эмали кончиком зонда проводят по ее поверхности у десневой борозды.

Критерии оценки:

0 баллов — налета в придесневой области нет (он не прилипает к кончику зонда);

1 балл — пленка налета в придесневой области определяется только зондом, к его кончику прилипает мягкое вещество, визуально налет не определяется;

2 балла — налет виден невооруженным глазом в десневом желобке и в придесневой области коронки зуба. Слой — от тонкого до умеренного;

3 балла — налет в избытке на большей части поверхности зуба, интенсивное отложение зубного налета в области десневой борозды и межзубных промежутков.

Индекс определяется как частное от деления суммы показателей на общее число обследованных зубов.

1. Упрощенный индекс гигиены полости рта (OHI−S, Green, Vermillion, 1964)

С помощью зонда исследуются индексные зубы: щечная поверхность 16, 26, язычная поверхность 36 и 46 и губная поверхность 11, 31. Движение зондом производят от режущего края к десне.

Критерии оценки:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| баллы | зубной налет (зн) | зубной камень (зк) |
| 0 | отсутствует | отсутствует |
| 1 | мягкий зубной налет покрывает до 1/3 коронки и/или любое количество плотного пигментного налета | наддесневой зубной камень до 1/3 коронки |
| 2 | налет покрывает от 1/3 до 2/3 поверхности | наддесневой зубной камень от 1/3 до 2/3 коронки и/или поддесневой зубной камень в виде отдельных глыбок |
| 3 | мягкий налет покрывает более 2/3 поверхности | наддесневой зубной камень более 2/3 коронки и/или поддесневой зубной камень циркулярно охватывает шейку зуба |

OHI-S = индекс зубного налета (∑(ЗН/n)) + индекс зубного камня(∑(ЗК/n)), где n – количество зубов.

Итерпретация результатов:

0–1,2 балла — низкий, хорошая гигиена;

1,3–3,0 балла — средний, удовлетворительная;

3,1–6,0 балла — высокий, неудовлетворительная;

6,0 баллов и более — очень высокий, плохая.

1. PMA -папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс (Parma С., 1960)

Оценка индекса РМА проводится по следующим критериям:

0 — отсутствие воспаления;

1 — воспаление только десневого сосочка (Р);

2 — воспаление маргинальной десны (М);

3 — воспаление альвеолярной десны (А).

Индекс РМА рассчитывают по формуле:

РМА = (Сумма баллов) / (3 х число зубов) \* 100%

Интерпретация результатов:

30% и менее - легкая степень тяжести гингивита;

31—60 % - средняя степень тяжести гингивита;

61% и выше - тяжелая степень тяжести гингивита.

1. Кровоточивость при зондировании (ВОР) (Аinаmo, Вау, 1975)

При определении индекса обследуют десну в области поверхностей зубов на предмет наличия (+) или отсутствия (-) кровоточивости. Степень выраженности гингивита и кровоточивости выражается в %.

ВОР = (количество кровоточащих точек)/(количество точек замера) \*100%

1. Индекс нуждаемости в пародонтологическом лечении CPITN (ВОЗ, 1978, Аinаmo et al., 1982)

Это комплексный пародонтальный индекс нуждаемости в лечении. Применяется для оценки состояния пародонта взрослого населения, для планирования профилактики и лечения, определения потребности в стоматологическом персонале, анализа и совершенствования лечебно-профилактических программ. С целью определения показателя используется пародонтальный зонд специальной конструкции, имеющий на конце шарик диаметром 0.5мм и черную полоску на расстоянии 3.5мм от кончика зонда. У пациентов исследуют пародонт в области шести групп зубов (17/16, 11, 26/27, 37/36, 31, 46/47) на нижней и верхней челюстях. Если в названном секстанте нет ни одного индексного зуба, то в этом секстанте осматриваются все сохранившиеся зубы.

Регистрация результатов исследования проводится согласно следующим кодам:

0 – здоровая десна, нет признаков патологии;

1 – после зондирования наблюдается кровоточивость десны;

2 – зондом определяется поддесневой зубной камень (черная полоска зонда не погружается в десневой карман);

3 – определяется карман 4-5мм (черная полоска зонда частично погружается в зубодесневой карман);

4 – определяется карман более 6мм (черная полоска зонда полностью погружена в десневой карман).

**2.3 Микробиологические и генетические методы исследования**

***2.3.1Забор материала***

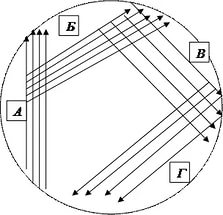
Забор материала из пародонтальных карманов пациентов для микробиологических исследований производили с помощью стерильных бумажных эндодонтических абсорберов Absorbent Paper Points, фирмы Euronda (размер №25), которые вводили в пародонтальные карманы на 10 секунд с обеспечением минимального контакта с атмосферным воздухом (после забора материала эндодонтические абсорберы Absorbent Paper Points, немедленно помещались в пробирку). Забранный материал помещали в стерильные пластмассовые пробирки типа Eppendorf, находящиеся в специальном устройстве для охлаждения. До взятия материала пациенты не применяли никаких лекарственных полосканий и не чистили зубы.

***2.3.2* *Культуральные среды и условия роста***

Культивирование факультативных анаэробов проводили на 1.5% плотной среде THB (Difco, США) с добавлением 0.5% дрожжевого экстракта (Helicon, Россия) и 5% крови барана при температуре 37°С и 5% СО2 в течение 18 часов.

***2.3.3*  *Выделение чистой культуры***

Рассев исходного биологического материала производили методом истощающего штриха (по Дригальски). Метод истощающего штриха предполагает высев культуры на поверхность агаризованной среды в чашку Петри. На первом этапе петлей с культурой наносят ряд параллельных штрихов на агаризованной среде (рис.2.3.1, А). Петлю стерилизуют, остужают о незасеянную часть агаризованной среды и проводят серию штрихов в направлении, перпендикулярном первым (рис.2.3.1, Б). Затем петлю вновь стерилизуют, остужают и штрихи наносят в направлении В (рис.2.3.1), а после очередной стерилизации – в направлении Г (рис.2.3.1). Чашку помещают в термостат и через определенное время учитывают результаты. Обычно на штрихах А и Б вырастает большое число колоний (иногда сплошной рост), тогда как на штрихах В и Г формируются изолированные колонии (http://studopedia.ru/7\_23671\_metodi-videleniya-chistoy-kulturi.html).



**Рис.2.3.1** Метод истощающего штриха

***2.3.4 Выделение тотальной ДНК из исходного биологического материала***

Тотальную ДНК из исходного биологического материала выделяли с помощью тест-системы для ПЦР «ДНК-экспресс» (Литех, Россия) в соответствии с инструкцией.

***2.3.5*  *Конструирование олигонуклеотидных праймеров***

Конструирование, анализ олигонуклеотидных праймеров и определение температуры плавления праймеров осуществляли с помощью компьютерных программ Primer 3 и OLIGO 4.0 (Таблица 2.3.1).

**Таблица 2.3.1**

Олигонуклеотидные праймеры *S.sanguinis* и *S.gordonii*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Название | 5’→3’ | Тотж. | Размер фрагмента  (п.н.) |
|  | ***S.sanguinis*** |  |  |  |
| 1 | Sang1 | GGATAGTGGCTCAGGGCAGCCAGTT | 59,7 | 313 |
| 2 | Sang2 | GAACAGTTGCTGGACTTGCTTGTC |  |  |
|  | ***S.gordonii*** |  |  |  |
| 3 | Gord1 | TGCTTTTCCACTCGACTCTCTC | 55,4 | 598 |
| 4 | Gord2 | TCCTGGAGCAAATTGATCTTGT |  |  |
| 5 | UniBF | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | 55,4 |  |
| 6 | UniBR | GGACTACCAGGGTATCTAAT | 51,9 |  |

***2.3.6 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)***

Полимеразная цепная реакция (ПЦР, PCR) – это метод ферментативного получения амплификаций (большого количества копий) исследуемых фрагментов ДНК путем повторных циклов репликации и денатурации (разделения цепи ДНК на отдельные нити). При этом происходит копирование только исследуемого участка ДНК, поскольку только этот участок соответствует заданным условиям и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце (http://doctorspb.ru/articles.php?article\_id=1049).

К 0,25 мкг геномной ДНК добавляли 10 мкмолей каждого из специфических праймеров, фланкирующих исследуемую последовательность, буфер с магнием для полимеразы, по 0,2 мМ каждого из 4 дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, объем доводили водой до 25 мкл. Добавляли 0,4 мкл термостабильной ДНК полимеразы. На поверхность жидкости наслаивали 40 мкл минерального масла. Пробирки помещали в амплификатор (Терцик, Россия). Смесь инкубировали при t 94 оС в течение 3 минут. Прибор программировали на цикл денатурации 94 oС на 15 секунд, цикл отжига праймеров на 15 секунд, цикл синтеза ДНК 72 oС на 20 секунд. Последовательность таких циклов повторялась 35 раз. После чего смесь инкубировали при t 72 oС в течение 5 минут. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе, приведены в таблице 2.3.1.

***2.3.7 Электрофорез и выделение ДНК из агарозного геля, определение концентрации ДНК***

Электрофорез ДНК проводили в 1,0% агарозном геле в горизонтальном аппарате «Hoefer HE 33» (Pharmacia, Швеция) с использованием ТАЕ буфера. Время электрофореза – 30 мин, напряжение устанавливали 70В. Для визуализации ДНК в ультрафиолетовых лучах в гель добавляли раствор бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Визуализацию результатов электрофореза проводили в ультрафиолетовом свете с использованием системы видеозахвата «Versa Doc MP 4000» (Bio Rad) и системы видеозахвата, использующей цифровой фотоаппарат (Olimpus, Япония) и компьютерную программу «Quantity One» (США).

Для расчета молекулярных масс исследуемых фрагментов ДНК использовали ДНК-маркер «100 bp Plus DNA ladder».

Выделение ДНК из агарозного геля осуществляли с использованием коммерческого набора "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen, США), согласно прилагаемой инструкции.

Концентрацию ДНК в пробах измеряли с помощью флюориметра «Qubit» с использования набора для измерений «Quant-iTTM dsDNA BR Assay kit, 100 assays \*2-1000 ng\*».

***2.3.8* *Определение антибиотикочуствительности***

Для определения антибиотикочувствительности использовали среду Мюллера-Хинтона с добавлением 5% крови барана.

Чистую выделеннную культуру инкубировали в течение 18 час. При t 37 oС. Затем 1 мл выращенной культуры центрифугировали при 8 тыс. оборотов в течение 1 мин., надосадок убирали, а к осадку добавляли 30 мкл свежего бульона и наносили на чашку с плотной средой, распределяя осадок клеток на всю поверхность чашки с помощью стеклянного шпателя. Затем на поверхность наносили диски с определенной концентрацией антибиотика. После этого чашки ставили на инкубацию при t 37 oС и 5% СО2 в течение 18 час.

Для исследования были выбраны антибиотики разных групп, представленные в таблице 2.3.2.

**Таблица 2.3.2** Антибиотики, выбранные для исследования

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № | Название антибиотика | Название группы антибиотика |
| 1 | Ампициллин | п/с пенициллины |
| 2 | Бензилпенициллин | природные пенициллины |
| 3 | Карбенициллин | п/с пенициллины |
| 4 | Оксациллин | п/с пенициллины |
| 5 | Имипенем | карбапенемы |
| 6 | Меропенем | карбапенемы |
| 7 | Цефазолин | цефалоспорины 1 поколения |
| 8 | Цефамандол | цефалоспорины 2 поколения |
| 9 | Цефепим | цефалоспорины 4 поколения |
| 10 | Цефоперазон | цефалоспорины 3 поколения |
| 11 | Цефотаксим | цефалоспорины 3 поколения |
| 12 | Цефтазидим | цефалоспорины 3 поколения |
| 13 | Амикацин | аминогликозиды 3 поколения |
| 14 | Гентамицин | аминогликозиды 2 поколения |
| 15 | Канамицин | аминогликозиды 1 поколения |
| 16 | Бацитрацин | полипептиды |
| 17 | Ванкомицин | гликопептиды |
| 18 | Амикацин | аминогликозиды 3 поколения |
| 19 | Ципрофлоксацин | фторхинолоны |
| 20 | Полимиксин | полимиксины |
| 21 | Пиперациллин | п/с пенициллины |
| 22 | Азитромицин | макролиды (азалиды) |

**ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**3.1 Результаты клинических исследований**

Анализ результатов полученных в ходе клинического исследования показал, что все обследованные пациенты предъявляли жалобы на кровоточивость при чистке зубов (100%), а также отек и воспаление десен (100%). Почти половина пациентов предъявили жалобу на неприятный запах из полости рта (43%). Некоторые пациенты жаловались на попадание пищи между зубами, кровоточивость во время приема пищи и самопроизвольную кровоточивость, зуд и жжение в деснах. Данные результаты представлены в таблице 3.1.1.

**Таблица 3.1.1**

Жалобы обследованных пациентов

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Жалоба | Число  пациентов | % |
| Кровоточивость при чистке зубов | 7 | 100 |
| Кровоточивость во время приема пищи | 2 | 29 |
| Самопроизвольная кровоточивость | 1 | 14 |
| Неприятный запах из полости рта | 3 | 43 |
| Зуд и жжение в деснах | 1 | 14 |
| Смещение зубов | 1 | 14 |
| Попадание пищи между зубами | 2 | 29 |
| Отек и воспаление десен | 7 | 100 |

При сборе анамнеза было установлено, что причиной развития ХГП трое пациентов считают наследственность, а четверо не знают о причинах развития ХГП.

Все пациенты отрицали наличие вредных привычек.

При оценке данных по гигиеническим навыкам пациентов (таблица 3.1.2), было установлено, что большинство из них чистит зубы ручной зубной щеткой 2 раза в день утром и вечером после еды. Никто не пользуется электрической зубной щеткой. Дополнительные средства гигиены, такие как ополаскиватель используют 2 пациента, флосс использует 1 пациент.

**Таблица 3.1.2**

Навыки индивидуальной гигиены полости рта обследованных пациентов

|  |  |
| --- | --- |
| Регулярность чистки зубов | Число пациентов |
| 2 раза в день утром и вечером после еды | 4 |
| 2 раза в день в любое удобное время | 2 |
| 1 раз в день | 1 |
| 1 раз в несколько дней | 0 |

При осмотре полости рта кариес зубов и его осложнения были выявлены у всех обследованных пациентов. Показатель КПУ составил 17.8, означающий очень высокую интенсивность кариеса.

При обследовании пациентов оценивали показатель клинической потери пародонтального прикрепления, который в среднем составил 3.7 мм.

Рецессия десны была выявлена у 5 пациентов, средняя длина которой составила 1,5 мм.

При проведении индексной оценки установлено, что индекс OHI-S у обследованных пациентов составил 3.5, Silness-Loe – 1.6, РМА – 39%, ВОР – 67.3% , CPITN – 2.0 (таблица 3.1.3).

**Таблица 3.1.3**

Показатели индексов гигиены и состояния тканей пародонта у обследованных пациентов

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Индексы | Показатель | Значение индекса |
| Green-Vermillion (OHI-S) | 3.5 | Плохая гигиена |
| Silness-Loe | 1.6 | Плохая гигиена |
| PMA, % | 39.0 | Средняя степень тяжести гингивита |
| ВОР, % | 67.3 |  |
| CPITN | 2.0 |  |

При изучении структуры патологических изменений полости рта, учитываемых в индексе CPITN, было выяснено, что у обследованных пациентов большую часть занимают коды 2 и 3, обозначающие наличие зубного камня и пародонтального кармана глубиной 4-5 мм.

Таким образом, все индексы отражают тот факт, что развитие хронического генерализованного пародонтита тесно связано с уровнем гигиены пациента, который у обследованных пациентов является неудовлетворительным. Наличие зубного налета и зубного камня является основополагающим фактором развития заболеваний пародонта. Под воздействием пародонтопатогенной микробиоты происходит утрата пародонтального прикрепления, что приводит к образованию пародонтальных карманов, характеризующихся разрушением соединительного эпителия, который защищает пародонт от микробных метаболитов.

**3.2 Результаты рентгенологического исследования**

При оценке ортопантомограмм и компьютерной томографии у всех обследованных пациентов было выявлено разрушение компактной пластинки альвеолярного гребня на всем протяжении зубного ряда и деструкция костной ткани альвеолярного отростка на 1/3.

Резорбция костной ткани привела к образованию внутрикостных пародонтальных карманов. Они были обнаружены у всех пациентов.

Таким образом, данные клинико – рентгенологического обследования пациентов позволяет достоверно поставить диагноз ХГП легкой степени тяжести.

**3.3 Результаты микробиологических исследований**

***3.3.1 Выделение факультативных анаэробов***

После культивирования исходных биологических образцов, взятых из пародонтальных карманов у каждого обследованного пациента, на чашках Петри были получены смешанные колонии.

Был произведен подсчет количества колониеобразующих единиц (КОЕ) факультативных анаэробов в исходном биологическом материале для того, чтобы определить какого количества микроорганизмов достаточно для возникновения и течения ХГП (таблица 3.3.1 и рис. 3.3.1).

**Таблица 3.3.1**

Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) факультативных анаэробов в исходном биологическом материале

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Образец | Номер культуры | Культура | КОЕ/мл |
| 1 | 1211, 1212 | *Rothia mucilaginosa* | 1 \* 105 |
| 2 | 221 | *Streptococcus gordonii* | 8.0 \* 106 |
|  | 24 | *Streptococcus anginosus* | 8.0 \* 106 |
| 3 | 311 | *Streptococcus mitis* | 1 \* 105 |
| 4 | 4212, 441 | *Streptococcus sanguinis* | 1.6 \* 106 |
|  | 43, 431 | *Streptococcus oralis* | 5.3 \* 105 |
| 5 | 511 | *Streptococcus sanguinis* | 5.3 \* 104 |
|  | 531 | *Streptococcus mitis* | 1.3 \* 104 |
| 6 | 61 | *Neisseria perflava* | 1.1 \* 105 |
|  | 62 | *Streptococcus oralis* | 2.1 \* 106 |
| 7 | 2111, 2121 | *Rothia mucilaginosa* | 5.4 \* 104 |

**Рис. 3.3.1** Количество колониеобразующих (КОЕ) единиц факультативных анаэробов в исходном биологическом материале

Для выделения чистых культур из каждой чашки Петри брали различные колонии и переносили на новые чашки (рис.3.3.2).

****

**Рис. 3.3.2** Образец выделенной чистой культуры *Streptococcus gordonii*

****

**Рис. 3.3.3** Чашка, демонстрирующая чистые культуры:

1– культура 61 (*Neisseria perflava)*;

2 – культура 1211 (*Rothia mucilaginosa)*;

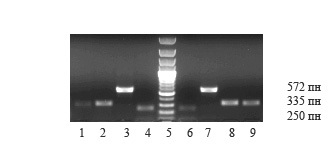
3 – культура 4212 (*Streptococcus sanguinis)*;

4 – культура 62 (*Streptococcus oralis).*

Выделенные чистые культуры были идентифицированы с помощью масс – спектрометрии, ПЦР и секвенирования.

***3.3.2 ПЦР-скрининг на пародонтопатогены***

На рисунке 3.3.4 представлен ПЦР-скрининг образцов 4 и 5, полученных из пародонтальных карманов пациентов с ХГП легкой степени тяжести.



**Рис. 3.3.4** ДНК-фрагменты после ПЦР и разделения в 1% агарозном геле

1, 9 - *P. intermedia* в образцах 4, 5;

2, 8 - *P. gingivalis* в образцах 4, 5;

3, 7 - *T. forsythia* в образцах 4, 5;

4, 6 - *A. actinomycetemcomitans* в образцах 4, 5;

5 - ДНК-маркер (100 пн – 3000 пн).

В таблице 3.3.2 представлены результаты ПЦР – скрининга на пародонтопатогены.

**Таблица 3.3.2**

Выявленные пародонтопатогены у пациентов с ХГП легкой степени тяжести методом ПЦР - диагностики

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Образец | *P.gingivalis* | *T.forsythia* | *P.intermedia* | *A.actinomycetemcomitans* |
| 1 | + | + | - | + |
| 2 | + | + | - | - |
| 3 | + | + | + | +/- |
| 4 | + | + | +/- | + |
| 5 | + | + | + | +/- |
| 6 | + | + | + | +/- |
| 7 | + | + | +/- | +/- |

Из результатов проведенного ПЦР – скрининга (таблица 3.3.2) видно, что пародонтопатогены *Porphyromonas gingivalis* и *Tannerella forsythia* быливыделены у всех обследованных пациентов (100%), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* былвыделен в 86 %, а *Prevotella intermedia -* в 71 %, что также отражено на рисунке 3.3.5.

**Рис. 3.3.5** Частота обнаружения основных пародонтопатогенов у обследованных пациентов с ХГП легкой степени тяжести

***3.3.3 Идентификация выделенных культур***

Идентификацию выделенных культур проводили с помощью масс-спектрометрии с использованием MALDI-TOF Microflex LT (Brucker Daltonics, Германия). Результаты масс-спектрометрии приведены в таблице 3.3.3.

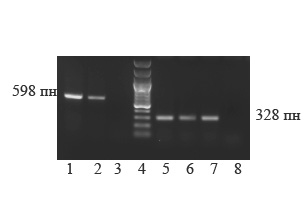
**Таблица 3.3.3**

Идентификация микроорганизмов с помощью MALDI Bityper

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Идентификационный номер культуры | Название микроорганизма | Вероятность идентификации |
| 1211 | Не определен | - |
| 1212 | Не определен | - |
| 221 | *Streptococcus gordonii* | Высокая |
| 24 | *Streptococcus anginosus* | Высокая |
| 311 | *Streptococcus pneumonia\** | Средняя |
| 4212 | *Streptococcus sanguinis* | Средняя |
| 43 | *Streptococcus oralis* | Средняя |
| 431 | *Streptococcus oralis* | Средняя |
| 441 | *Streptococcus sanguinis* | Средняя |
| 511 | *Streptococcus sanguinis* | Средняя |
| 531 | Не определен | - |
| 61 | *Neisseria perflava* | Средняя |
| 62 | Не определен | - |
| 2111 | *Rothia mucilaginosa* | Высокая |
| 2121 | *Rothia mucilaginosa* | Высокая |

\*Культуры *Streptococcus pneumonia, Streptococcus mitis* и *Streptococcus oralis* имеют очень высокую степень совпадения.

Культуры 221, 441, 4212, 511 были также идентифицированы с помощью метода ПЦР, используя специфические праймеры на *Streptococcus sanguinis* и *Streptococcus gordonii* (см. материалы и методы исследования). Рисунок 3.3.6 демонстрирует результаты идентификации.



**Рис.3.3.6** ДНК-фрагменты после ПЦР и разделения в 1% агарозном геле

1, 2 – ДНК-фрагмент, соответствующий *S.gordonii,* культура 221;

3 – ДНК-фрагмент, соответствующий *S. gordonii,* культура 511;

4 – ДНК-маркер (100-1500 пн);

5 – ДНК-фрагмент, соответствующий *S. sanguinis,* культура 511;

6– ДНК-фрагмент, соответствующий *S. sanguinis,* культура 441;

7– ДНК-фрагмент, соответствующий *S. sanguinis,* культура 4212;

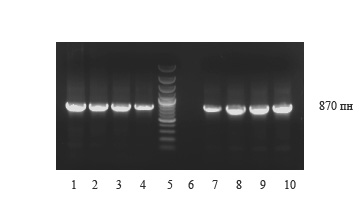
8– ДНК-фрагмент, соответствующий *S. sanguinis,* культура 221;

Таким образом, анализируя полное совпадение результатов масс-спектрометрии и ПЦР, можно заключить, что культура 221 представляет собой *S.gordonii,* а культуры 441, 4212 и 511 представляют собой *S. sanguinis.*

Культуры, которые не удалось идентифицировать с помощью масс-спектрометрии (1211, 1212, 311, 531, и 62) идентифицировали методом секвенирования ДНК, кодирующую 16S рибосомальную РНК.

* ***Подготовка проб ДНК - фрагментов для секвенирования***

ДНК-фрагменты, кодирующие 16S рибосомальную РНК, получали с помощью ПЦР, используя в качестве матрицы ДНК, выделенную из чистых культур 1211, 1212, 311, 531, и 62. После разделения ДНК-фрагментов в 1,0% агарозном геле полученные фрагменты выделяли из геля с помощью набора " AxyPrep DNA Gel Extraction Kit" (Axygen Scientific, США), согласно прилагаемой инструкции. Рис. 3.3.7 демонстрирует разделение ДНК-фрагментов для культур 1211 и 311.



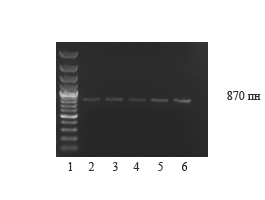
**Рис. 3.3.7** ДНК-фрагменты культур 1211 и 311 после ПЦР с последующим разделением в 1,0% агарозном геле

1-4 – ДНК-фрагмент, соответствующий культуре 1211;

5 – ДНК-маркер (100-1500 пн);

7-10 - ДНК-фрагмент, соответствующий культуре 311.

Контроль выделения ДНК-фрагментов проводили с помощью электрофореза в 1,0% агарозном геле (рис. 3.3.8). Наносили по 3 мкл каждой пробы.



**Рис. 3.3.8** ДНК-фрагменты культур 1211 и 311 после выделения и очистки с последующим разделением в 1,0% агарозном геле

1 - ДНК-маркер (100-1500 пн);

2 - ДНК-фрагмент, соответствующий культуре 1211;

3 - ДНК-фрагмент, соответствующий культуре 1211;

4 - ДНК-фрагмент, соответствующий культуре 1211;

5 - ДНК-фрагмент,соответствующий культуре 311;

6 - ДНК-фрагмент, соответствующий культуре 1211.

Концентрацию чистой ДНК в пробах измеряли с помощью флюориметра «Qubit» с использованием набора для измерений «Quant-iTTM dsDNA BR Assay kit, 100 assays \*2-1000 ng\*».

Результаты измерений:

* 1211 - 24 мкг/мл;
* 1212 – 29 мкг/мл;
* 311 – 29 мкг/мл;
* 531 – 29 мкг/мл;
* 62 – 26 мкг/мл.

Секвенирование выполняли сотрудники Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» («РМКТ») на базе СПбГУ.

* ***Результаты секвенирования***

Сравнение сиквенсов выполняли с использованием программы сравнения и базы данных на сайте: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Результат сравнения сиквенсов для культуры 1211 и *Rothia mucilaginosa,* штамм TeTT представлен на рис.3.3.9. Начиная с 11 нуклеотида, сравнительный анализ показывает 99% совпадения двух сиквенсов, что позволяет идентифицировать культуру 1211 как *Rothia mucilaginosa.*

Результаты сравнения сиквенсов для культур 1212, 311, 531 и 62 представлены в приложении 2.

1211 11 TACACATGCAGTCGACGATGAAGCCTAGCTTGCTAGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAG 70

||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

*R.muc* 13 TAC-CATGCAGTCGACGATGAAGCCTAGCTTGCTAGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAG 71

1211 71 TAATACGTGAGTAACCTACCTTTAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACC 130

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

*R.muc* 72 TAATACGTGAGTAACCTACCTTTAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACC 131

1211 131 GGATACGACCAATCTCCGCATGGGGTGTTGGTGGAAAGCGTTATGTAGTGGTTATAGATG 190

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

*R.muc* 132 GGATACGACCAATCTCCGCATGGGGTGTTGGTGGAAAGCGTTATGTAGTGGTTATAGATG 191

1211 191 GGCTCACGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGC 250

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

*R.muc* 192 GGCTCACGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGC 251

1211 251 CGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG 310

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

*R.muc* 252 CGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG 311

1211 311 GCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGG 370

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

*R.muc* 312 GCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGG 371

1211 371 ATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTGTTAGCAGGGAAGAAGAGAGATTGACGGTACCT 430

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

*R.muc* 372 ATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTGTTAGCAGGGAAGAAGAGAGATTGACGGTACCT 431

1211 431 GCAGAGAAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCG 490

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

*R.muc* 432 GCAGAGAAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCG 491

1211 491 TTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTTTGTCGCGTCTGCTGTGAAAG 550

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

*R.muc* 492 TTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTTTGTCGCGTCTGCTGTGAAAG 551

1211 551 GCCGGGGCTTAACTCCGTGTATTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAG 610

||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

*R.muc* 552 GCCGGGGCTTAACCCCGTGTATTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAG 611

1211 611 ACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAA 670

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

*R.muc* 612 ACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAA 671

1211 671 GGCAGGTCTCTGGGCTGTAACTGACGCTGAGAAGCGAAAAGCATGGGGAGCGAACAGGAT 730

|||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||

*R.muc* 672 GGCAGGTCTCTGGGCTGTAACTGACGCTGAGAAGCG-AAAGCATGGGGAGCGAACAGGAT 730

1211 731 TAGATACCCTTGGT 744

|||||||||| |||

*R.muc* 731 TAGATACCCT-GGT 743

**Рис. 3.3.9** Результат сравнения сиквенсов для культуры 1211 и *Rothia mucilaginosa,* штамм TeTT

Результаты идентификации выделенных пяти культур с использованием секвенирования ДНК-фрагментов, кодирующих 16S рибосомальную РНК, представлены в таблице 3.3.4.

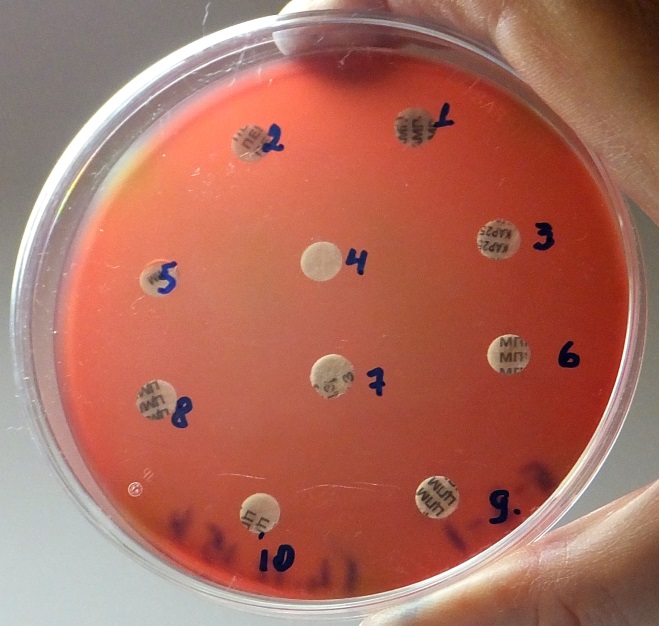
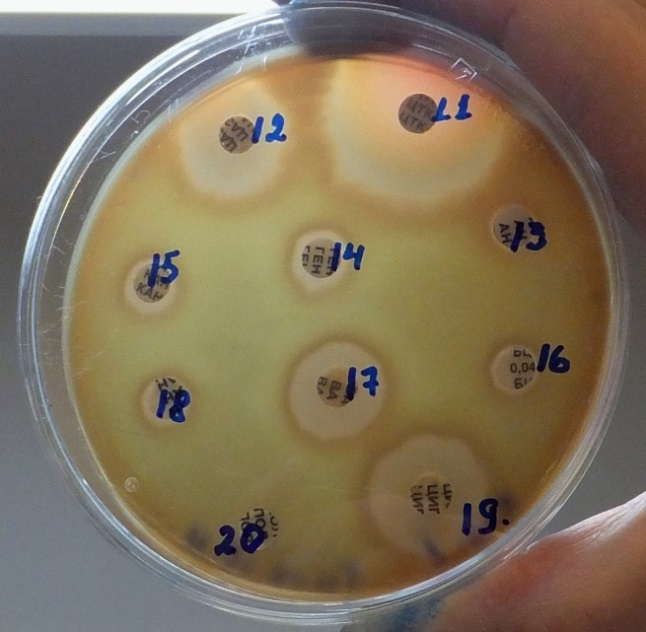
**Таблица 3.3.4**

Идентификация выделенных культур с помощью секвенирования ДНК-фрагментов, кодирующих 16S рибосомальную РНК

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № | Чистая культура | Название микроорганизма | Степень идентификации |
| 1 | 1211 | *Rothia mucilaginosa* | 99% |
| 2 | 1212 | *Rothia mucilaginosa* | 99% |
| 3 | 311 | *Streptococcus mitis* | 99% |
| 4 | 531 | *Streptococcus mitis* | 99% |
| 5 | 62 | *Streptococcus oralis* | 99% |

**3.4. Анитибиотикочувствительность идентифицированных чистых культур**

Результаты антибиотикочувствительности идентифицированных чистых культур представлены на рис. 3.4.1 и в таблицах 3.4.1 и 3.4.2

**Рис. 3.4.1** Результаты антибиотикочувствительности культуры 531- *Streptococcus mitis*

На основании результатов антибиотикочувствительности в приведенных ниже таблицах 3.4.1 и 3.4.2 можно сделать выводы, что все идентифицированные нами микроорганизмы чувствительны к Азитромицину (относительно новый препарат из группы макролидов на Российском рынке) и практически все микроорганизмы чувствительны к антибиотикам из группы бета-лактамов, кроме *Streptococcus sanguinis*, *Neisseria perflava* и некоторых штаммов *Rothia mucilaginosa.*Также эти микроорганизмы устойчивы к препарату из группы фторхинолонов Ципрофлоксацину, к которому в свою очередь чувствительны остальные микроорганизмы. Наибольшую устойчивость микроорганизмы проявили к полимиксинам, аминогликозидам и полипептидам.

**Таблица 3.4.1**

Антибиотикочувствительность идентифицированных чистых культур

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **М/О** | **АНТИБИОТИКИ** | | | | | | | | | | |
| **Бензил-Пенициллин** | **Оксациллин** | **Ампициллин** | **Карбенициллин** | **Пиперациллин** | **Цефазолин** | **Цефамандол** | **Цефоперазон** | **Цефотаксим** | **Цефтазидим** | **Цефепим** |
| ***R.mucilaginosa*** | **у** | **у** | **у** | **ч** | **ч** | **п** | **ч** | **ч** | **ч** | **п** | **ч** |
| ***R.mucilaginosa*** | **у** | **ч** | **у** | **ч** | **-** | **ч** | **ч** | **п** | **п** | **п** | **п** |
| ***S.gordonii*** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **-** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** |
| ***S.anginosus*** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **-** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **п** | **ч** |
| ***S.mitis*** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **-** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** |
| ***S.sanguinis*** | **у** | **у** | **у** | **п** | **ч** | **у** | **п** | **у** | **п** | **п** | **п** |
| ***S.oralis*** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **-** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** |
| ***S.sanguinis*** | **у** | **ч** | **у** | **ч** | **-** | **п** | **п** | **у** | **п** | **ч** | **п** |
| ***S.mitis*** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **-** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** |
| ***N.perflava*** | **у** | **у** | **у** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **п** | **ч** | **ч** |
| ***S.orlis*** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** |
| ***R.mucilagenosa*** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** |
| ***R.mucilagenosa*** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** |

* Ч – чувствительны
* П – промежуточно чувствительны
* У - устойчивы

**Таблица 3.4.1**

Антибиотикочувствительность идентифицированных чистых культур

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **М/О** | **АНТИБИОТИКИ** | | | | | | | | | |
| **Имипенем** | **Меропенем** | **Ванкомицин** | **Азитромицин** | **Ципрофлоксацин** | **Полимиксин** | **Канамицин** | **Гентамицин** | **Амикацин** | **Бацитрацин** |
| ***R.mucilaginosa*** | **ч** | **ч** | **ч** | **-** | **у** | **-** | **у** | **у** | **у** | **у** |
| ***R.mucilaginosa*** | **п** | **п** | **ч** | **п** | **у** | **ч** | **у** | **у** | **у** | **у** |
| ***S.gordonii*** | **ч** | **ч** | **ч** | **-** | **ч** | **у** | **у** | **п** | **у** | **у** |
| ***S.anginosus*** | **ч** | **ч** | **ч** | **п** | **п** | **ч** | **у** | **у** | **у** | **у** |
| ***S.mitis*** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **у** | **ч** | **у** | **у** |
| ***S.sanguinis*** | **ч** | **ч** | **ч** | **-** | **у** | **-** | **у** | **у** | **у** | **у** |
| ***S.oralis*** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **у** | **п** | **у** | **у** |
| ***S.sanguinis*** | **п** | **ч** | **ч** | **-** | **п** | **у** | **у** | **п** | **у** | **у** |
| ***S.mitis*** | **ч** | **ч** | **ч** | **-** | **п** | **у** | **у** | **у** | **у** | **у** |
| ***N.perflava*** | **ч** | **ч** | **у** | **-** | **у** | **-** | **п** | **ч** | **п** | **у** |
| ***S.orlis*** | **ч** | **ч** | **ч** | **-** | **п** | **-** | **у** | **у** | **у** | **у** |
| ***R.mucilagenosa*** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **у** | **п** | **-** | **ч** | **-** |
| ***R.mucilagenosa*** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **ч** | **у** | **-** | **у** | **-** |

* Ч – чувствительны
* П – промежуточно чувствительны
* У – устойчивы

**ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ**

**4.1. Заключение**

Целью настоящего исследования являлась оценка антибиотикочувствительности микробиоты пародонтальных карманов у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) легкой степени тяжести.

В исследовании приняли участие 7 пациентов в возрасте от 35 до 54 лет с ХГП легкой степени тяжести без тяжелой сопутствующей патологии. Были собраны жалобы пациентов и анамнез; проведены клинические (индексная оценка состояния тканей пародонта) и рентгенологические исследования; микробиологические и генетические исследования (культивирвание микроорганизмов, масс – спектрометрия, постановка ПЦР и секвенирование). В ходе исследования была изучена чувствительность идентифицированных чистых культур к антибиотикам разных групп (бета-лактамам, аминогликозидам, полипептидам, фторхинолонам, полимиксинам и макролидам).

Анализ результатов индексной оценки гигиены и состояния тканей пародонта показал, что все индексы соответствуют ХГП легкой степени тяжести и отражают тот факт, что развитие ХГП тесно связано с уровнем гигиены пациента, который у обследованных нами пациентов оказался неудовлетворительным. Наличие зубного налета и зубного камня несомненно является основополагающим фактором в развитии ВЗП. Воздействие пародонтопатогенов приводит к утрате пародонтального прикрепления и в последующем к образованию пародонтальных карманов, характеризующихся разрушением соединительного эпителия, который защищает пародонт от микробных метаболитов.

По результатам проведенного ПЦР – скрининга на пародонтопатогены у всех обследованных пациентов были выявлены *Porphyromonas gingivalis* и *Tannerella forsythia*, также у некоторых пациентов были выявлены *Actinobacillus actinomycetemcomitans*  и *Prevotella intermedia*.

С помощью масс - спектрометрии проводили идентификацию выделенных чистых культур. Были идентифицированы факультативные анаэробы: *Streptococcus gordonii, Streptococcus anginosus, Streptococcus sanguinis, Streptococcus oralis, Neisseria perflava, Rothia mucilaginosa.*

Был также произведен подсчет количества колониеобразующих единиц (КОЕ) факультативных анаэробов в исходном биологическом материале и составил 104 – 105 КОЕ/мл. Можно предположить, что этой концентрации достаточно для возникновения и течения ХГП легкой степени тяжести.

При проведении секвенирования ДНК-фрагментов, кодирующих 16S рибосомальную РНК, были идентифицированы: *Rothia mucilaginosa, Streptococcus mitis* и *Streptococcus oralis.*

По полученным нами результатам антибиотикочувствительности можно сделать заключение, что все идентифицированные микроорганизмы чувствительны к Азитромицину (относительно новый препарат из группы макролидов на Российском рынке) и практически все микроорганизмы чувствительны к антибиотикам из группы бета-лактамов, кроме *Streptococcus sanguinis*, *Neisseria perflava* и некоторых штаммов *Rothia mucilaginosa.*Также эти микроорганизмы устойчивы к препарату из группы фторхинолонов Ципрофлоксацину, к которому в свою очередь чувствительны остальные идентифицированные нами микроорганизмы. Наибольшую устойчивость микроорганизмы проявили к полимиксинам, аминогликозидам и полипептидам.

Эти данные согласуются с данными проведенных исследований по данной теме: «Анализ чувствительности микробных ассоциаций, выделенных у пациентов с пародонтитом, к антибиотикам» (Володина Е.В., Багдасарян В.А., 2014); «Дифференцированное применение антибиотиков в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита" (Галабуева А.И., 2005); "Эффективность комплексного лечения пародонтита с применением антибиотиков по результатам теста индивидуальной чувствительности микрофлоры" (Шарапудинова М.Г., 2009).

Все поставленные задачи исследования были выполнены и сделаны соответствующие выводы.

**4.2. Выводы**

1. Изучение состава микробиоты пародонтальных карманов у пациентов с ХГП легкой степени тяжести показало преобладание факультативных анаэробов рода *Streptococcus* в концентрации 104-105 КОЕ/мл.

2. ПЦР-скрининг на выявление пародонтопатогенов показал, что уже при ХГП легкой степени тяжести у всех пациентов в пародонтальных карманах обнаруживаются *Porphyromonas gingivalis* и *Tannerella forsythia*. У 86 % пациентов с ХГП легкой степени тяжести выявлены *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, у 71% - *Prevotella intermedia.*

3. Выделенные из пародонтальных карманов факультативные анаэробы высоко чувствительны к бета-лактамам, макролидам и фторхинолонам. Выявлена устойчивость большинства выделенных микроорганизмов к аминогликозидам, полимиксинам, полипетидам.

**4.3. Практические рекомендации**

1.Для проведения антибиотикотерапии у пациентов ХГП легкой степени тяжести следует рекомендовать антибиотики из группы бета-лактамов, макролидов или фторхинолонов.

2. Алгоритм обследования пациентов с ХГП легкой степени тяжести должен включать исследование чувствительности микробиоты пародонтальных карманов к антибиотикам.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Артюшевич А.С., Трофимова Е.К., Латышева С.В. Клиническая периодонтология: Практ.пособие. - Москва, 2002. - 303с.
2. Барер Г.М. Терапевтическая стоматология, часть 2. Заболевания пародонта. - Москва, 2013. – 224 с.
3. Боровский Е. В., Леонтьев В. К. Биология полости рта. – Москва,2001. – 303с.
4. Боровский Е. В. Терапевтическая стоматология: Учебник для студентов медицинских вузов. – Москва, 2003. – 840с.
5. Володина Е. В., Багдасарян В. А. Анализ чувствительности микробных ассоциаций, выделенных у пациентов с пародонтитом, к антибиотикам. – Электронный научно-образовательный вестник. Здоровье и образование в ХХI веке. Т 16 (12). – 2014.
6. Волошина А. А. Значение микробного фактора в развитии и течении воспалительных заболеваний пародонта. – Москва, журнал «Молодой ученый» №1, 2011. – 248 - 251 с.
7. Галабуева А. И. Дифференцированное применение антибиотиков в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита.- Москва, 2005. – 129 с.
8. Герберт Ф. Вольф, Эдит М. Ратейцхак, Клаус Ратейцхак. Пародонтология. По ред. проф. Г.М. Барера. – Казань,2007. – 548с.
9. Григорьян А. С., Грудянов А. И., Рабухина Н. А. Болезни пародонта: Патогенез, диагностика, лечение. – Москва, 2004. – 320 с.
10. Григорьян А. С., Рахметова С. Ю., Зырянова Н. В. Микроорганизмы в заболеваниях пародонта: экология, патогенез, диагностика. – Москва, 2007. – 56 с.
11. Грудянов А. И., Овчинникова В. В, Дмитриева Н. А. Антимикробная и противовоспалительная терапия в пародонтологии. – Москва,2004.– 80 с.
12. Данилевский Н. Ф., Борисенко А. В. Заболевания пародонта. - Киев, 2000. – 464 с.
13. Дмитриева Л. А. Пародонтит. – Москва, 2007.– 504 с.
14. Дмитриева Л. А. Пародонтология. Национальное руководство.- Москва, 2013. – 712 с.
15. Елисеева А.Ф. Сочетание поражений пародонта и сердечно-сосудистых заболеваний. Клинико - морфологическое и микробиологическое исследование. - СПб, 2014.
16. Зеленова Е. Г., Заславская М. И., Салина Е. В. Микрофлора полости рта: норма и патология. Учебное пособие. Нижний Новгород, 2004. – 158 с.
17. Иванов В. С. Заболевания пародонта, 3 - е изд. – Москва, 1998. – 296 с.
18. Лабинская А. С., Костюкова Н. Н. Руководство по медицинской микробиологии. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика. - Москва, 2008. – 441с.
19. Майкл Ньюман, Арье ван Винкельхофф. Антимикробные препараты в стоматологической практике. – Москва, 2004. – 328 с.
20. Максимовский Ю. М., Дмитриева Л. А. Терапевтическая стоматология. Национальное руководство. – Москва, 2009. 912 с.
21. Малоньин И. В., Емелина Г. В., Иванов П. В. Оценка заболеваемости воспалений тканей пародонта в Пензинском районе. Фундаментальные исследования, 2010 - №2. - 80-86 с.
22. Маркина Т. В., Майборода Ю. Н., Урясьева Э. В. Бактериальный спектр слизистой оболочки органов рта и пародонтальных карманов у пациентов с пародонтитом.– Медицинский вестник Северного Кавказа, Т.8, №1– 2013. – 45 – 47 с.
23. Мюллер Х. П. Пародонтология. Науч. ред. изд. на русск. яз. проф. А. М. Политун, пер. с нем. – Львов, 2004. – 256 с.
24. Орехова Л. Ю. Заболевания пародонта. – Москва, 2004. – 432с.
25. Пашкова Г. С., Вавилова Т. П., К.А. Пашков К. А. О взаимосвязи соматической патологии с заболеваниями пародонта у жителей г. Москвы. - 2007.
26. Ричард Дж. Ламонт, Роберт А. Берне. Микробиология и иммунология для стоматологов. Под ред. проф. В.К. Леонтьева. – Москва, 2010. – 502 с.
27. Семина Н. А., Сидоренко С. В. Методические указания МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. - Москва, 2004.
28. Тамарова Э. Р., Масагутова Н. Р. Молекулярно – генетическая характеристика микрофлоры полости рта при пародонтите.– Вестник Челябинского государственного университета, № 7 (298), выпуск 2. -70 – 71 с. - 2013.
29. Тумшевиц О. Н. Современная клиническая медицина: изучение этиологии и патогенеза заболеваний, разработка методов их профилактики, диагностики и лечения. Сборник материалов международной научной конференции, Москва, 2013. - Киров, 2013. – 367 с.
30. Царев В. И., Давыдова М.М. Микробиология полости рта. – Москва, 2008. – 50 с.
31. Царев В. И., Ушаков Р. В. Антимикробная терапия в стоматологии. – Москва, 2006. – 144 с.
32. Царев В. И., Ушаков Р. В. Местное антимикробное лечение в стоматологии. – Москва, 2004. – 136 с.
33. Цепов Л. М., Николаев А. И., Михеева Е. А. Диагностика, лечение и профилактика заболеваний пародонта, 3-е изд. - Москва, 2008. – 272с.
34. Чухловин А. Б. , Соловьева А. М., Матело С.К. Микробные маркеры заболеваний пародонта и их практическая значимость в стоматологии. - Бюллетень экспериментальной биологии и медицины , 2007. - 5с.
35. Шарапудинова М. Г. Эффективность комплексного лечения пародонтита с применением антибиотиков по результатам теста индивидуальной чувствительности микрофлоры. – Москва, 2009. – 113 с.
36. Юдина Н.А., Люговская А.В., Курочкина А.Ю. Антимикробная терапия при лечении болезней периодонта: Учебно – методическое пособие. – Минск, 2009. – 44 с.
37. <http://studopedia.ru/7_23671_metodi-videleniya-chistoy-kulturi.html>
38. <http://doctorspb.ru/articles.php?article_id=1049>
39. <https://vivaldi.nlr.ru/bd000298907/view#page=25>
40. <http://www.studfiles.ru/preview/469464/page:2>

**ПРИЛОЖЕНИЯ**

Приложение 1

**Карта обследования стоматологического пациента (**Страница 1)



Приложение 1

**Карта обследования стоматологического пациента** (Страница 2)



Приложение 1

**Карта обследования стоматологического пациента** (Страница 3)



Приложение 2

**Результат сравнения сиквенсов** **для культуры 1212 и *Rothia mucilaginosa***

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1352 | 4058 | 99% | 0.0 | 99% | [AP014938.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/915386764?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=67&RID=FFDHXPWD015) |

*Rothia mucilaginosa* DNA, complete genome, strain: NUM-Rm6536

Sequence ID: [dbj|AP014938.1|](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/915386764?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=67&RID=FFDHXPWD015)Length: 2292716Number of Matches: 3

Related Information

Range 1: 329658 to 330408[GenBank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/915386764?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=67&RID=FFDHXPWD015&from=329658&to=330408)[Graphics](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/915386764?report=graph&rid=FFDHXPWD015%5b915386764%5d&tracks=%5bkey:sequence_track,name:Sequence,display_name:Sequence,id:STD1,category:Sequence,annots:Sequence,ShowLabel:true%5d%5bkey:gene_model_track,CDSProductFeats:false%5d%5bkey:alignment_track,name:other%20alignments,annots:NG%20Alignments%7CRefseq%20Alignments%7CGnomon%20Alignments%7CUnnamed,shown:false%5d&v=329621:330445&appname=ncbiblast&link_loc=fromHSP) Next Match Previous Match

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Alignment statistics for match #1 | | | | |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
| 1352 bits(732) | 0.0 | 747/753(99%) | 5/753(0%) | Plus/Minus |
|  |  |  |  |  |

Query 2 GGCGGCCGT-CTT-ACACATGC-AGTCGAACGATGAAGCCTAGCTTGCTAGGTGGATTAG 58

||||| ||| ||| |||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 330408 GGCGG-CGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCTAGCTTGCTAGGTGGATTAG 330350

Query 59 TGGCGAACGGGTGAGTAATACGTGAGTAACCTACCTTTAACTCTGGGATAAGCCTGGGAA 118

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 330349 TGGCGAACGGGTGAGTAATACGTGAGTAACCTACCTTTAACTCTGGGATAAGCCTGGGAA 330290

Query 119 ACTGGGTCTAATACCGGATACGACCAATCTCCGCATGGGGTGTTGGTGGAAAGCGTTATG 178

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 330289 ACTGGGTCTAATACCGGATACGACCAATCTCCGCATGGGGTGTTGGTGGAAAGCGTTATG 330230

Query 179 TAGTGGTTATAGATGGGCTCACGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG 238

|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||

Sbjct 330229 TAGTGGTTATAGATGGGCTCACGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAG 330170

Query 239 GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC 298

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 330169 GCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC 330110

Query 299 AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGC 358

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 330109 AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGC 330050

Query 359 GACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTGTTAGCAGGGAAGAAGAG 418

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 330049 GACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTGTTAGCAGGGAAGAAGAG 329990

Query 419 AGATTGACGGTACCTGCAGAGAAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA 478

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 329989 AGATTGACGGTACCTGCAGAGAAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA 329930

Query 479 CGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTTTGTCG 538

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 329929 CGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTTTGTCG 329870

Query 539 CGTCTGCTGTGAAAGGCCGGGGCTTAACTCCGTGTATTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAG 598

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 329869 CGTCTGCTGTGAAAGGCCGGGGCTTAACTCCGTGTATTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAG 329810

Query 599 AGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGG 658

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 329809 AGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGG 329750

Query 659 AACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCATGG 718

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 329749 AACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCATGG 329690

Query 719 GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAAGTCC 751

|||||||||||||||||||||||||||| ||||

Sbjct 329689 GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTA-GTCC 329658

Приложение 2

**Результат сравнения сиквенсов** **для культуры 311 и *Streptococcus mitis***

*Streptococcus mitis* ATCC 15914 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|AY281076.1|](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/32396617?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=84&RID=FFEB6364015)Length: 1430Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 15 to 788[GenBank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/32396617?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=84&RID=FFEB6364015&from=15&to=788)[Graphics](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/32396617?report=graph&rid=FFEB6364015%5b32396617%5d&tracks=%5bkey:sequence_track,name:Sequence,display_name:Sequence,id:STD1,category:Sequence,annots:Sequence,ShowLabel:true%5d%5bkey:gene_model_track,CDSProductFeats:false%5d%5bkey:alignment_track,name:other%20alignments,annots:NG%20Alignments%7CRefseq%20Alignments%7CGnomon%20Alignments%7CUnnamed,shown:false%5d&v=0:826&appname=ncbiblast&link_loc=fromHSP) Next Match Previous Match

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Alignment statistics for match #1 | | | | |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
| 1387 bits(751) | 0.0 | 770/778(99%) | 6/778(0%) | Plus/Plus |
|  |  |  |  |  |

Query 4 CGGCGTTTCCT-ATACATGCAAGTAGAACGCTG-AGAGAGGAGCTTGCTCTTCTTGGATG 61

||||| | ||| ||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 15 CGGCG-TGCCTAATACATGCAAGTAGAACGCTGAAGAGAGGAGCTTGCTCTTCTTGGATG 73

Query 62 AGTTGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTGGTAGCGGGGGATAACTATTGG 121

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 74 AGTTGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTGGTAGCGGGGGATAACTATTGG 133

Query 122 AAACGATAGCTAATACCGCATAAAATGGATTATCGCATGATAATTCATTGAAAGGTGCAA 181

|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||

Sbjct 134 AAACGATAGCTAATACCGCATAAAATGGATTATCGCATGATAATCCATTGAAAGGTGCAA 193

Query 182 ATGCATCACTACCAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTCACC 241

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 194 ATGCATCACTACCAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTCACC 253

Query 242 AAGGCGACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG 301

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 254 AAGGCGACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG 313

Query 302 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGGAAGTCTGACCG 361

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 314 CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGGAAGTCTGACCG 373

Query 362 AGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAA 421

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 374 AGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAA 433

Query 422 CGAGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGGACGGCTAAC 481

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 434 CGAGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGGACGGCTAAC 493

Query 482 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT 541

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 494 TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT 553

Query 542 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTAGATAAGTCTGAAGTTAAAGGCTGTGGCTTAACCATAGTAC 601

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 554 AAAGCGAGCGCAGGCGGTTAGATAAGTCTGAAGTTAAAGGCTGTGGCTTAACCATAGTAC 613

Query 602 GCTTTGGAAACTGTTTAACTTGAGTGCAAGAGGGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGT 661

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 614 GCTTTGGAAACTGTTTAACTTGAGTGCAAGAGGGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGT 673

Query 662 GAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCTTGTAAACT 721

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||

Sbjct 674 GAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCTTGT-AACT 732

Query 722 GACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGGTAGCTCCA 779

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||| ||||

Sbjct 733 GACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG-TAG-TCCA 788

Приложение 2

**Результат сравнения сиквенсов** **для культуры 531 и *Streptococcus mitis***

*Streptococcus mitis* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|HQ219654.1|](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/345296744?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=1&RID=FFG0DAEJ014)Length: 1401Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 1 to 762[GenBank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/345296744?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=1&RID=FFG0DAEJ014&from=1&to=762)[Graphics](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/345296744?report=graph&rid=FFG0DAEJ014%5b345296744%5d&tracks=%5bkey:sequence_track,name:Sequence,display_name:Sequence,id:STD1,category:Sequence,annots:Sequence,ShowLabel:true%5d%5bkey:gene_model_track,CDSProductFeats:false%5d%5bkey:alignment_track,name:other%20alignments,annots:NG%20Alignments%7CRefseq%20Alignments%7CGnomon%20Alignments%7CUnnamed,shown:false%5d&v=0:800&appname=ncbiblast&link_loc=fromHSP) Next Match Previous Match

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Alignment statistics for match #1 | | | | |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
| 1391 bits(753) | 0.0 | 760/763(99%) | 1/763(0%) | Plus/Plus |
|  |  |  |  |  |

Query 2 CTATACATGCAGTAGAACGCTGAAGGAGGAGCTTGCTTCTCTGGATGAGTTGCGAACGGG 61

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 1 CTATACATGCAGTAGAACGCTGAAGGAGGAGCTTGCTTCTCTGGATGAGTTGCGAACGGG 60

Query 62 TGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTGGTAGCGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAA 121

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 61 TGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTGGTAGCGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAA 120

Query 122 TACCGCATAAGAGTAGATGTTGCATGACATTTGCTTAAAAGGTGCAATTGCATCACTACC 181

|||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 121 TACCGCATAATAGTAGATGTTGCATGACATTTGCTTAAAAGGTGCAATTGCATCACTACC 180

Query 182 AGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATAC 241

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 181 AGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATAC 240

Query 242 ATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC 301

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 241 ATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC 300

Query 302 GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGGAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGT 361

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 301 GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGGAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGT 360

Query 362 GAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAACGAGTGTGAGAGT 421

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 361 GAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAACGAGTGTGAGAGT 420

Query 422 GGAAAGTTCACACTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAG 481

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 421 GGAAAGTTCACACTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAG 480

Query 482 CCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG 541

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 481 CCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAG 540

Query 542 GCGGTTAGATAAGTCTGAAGTTAAAGGCTGTGGCTTAACCATAGTACGCTTTGGAAACTG 601

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 541 GCGGTTAGATAAGTCTGAAGTTAAAGGCTGTGGCTTAACCATAGTACGCTTTGGAAACTG 600

Query 602 TTTAACTTGAGTGCAAGAGGGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT 661

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 601 TTTAACTTGAGTGCAAGAGGGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT 660

Query 662 ATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCTTGTAACTGACGCTGAGGCTCG 721

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 661 ATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCTTGTAACTGACGCTGAGGCTCG 720

Query 722 AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTGGTTCCA 764

|||||||||||||||||||||||||||||||||||| || |||

Sbjct 721 AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT-CCA 762

Приложение 2

**Результат сравнения сиквенсов** **для культуры 62 и *Streptococcus oralis***

*Streptococcus sp. oral* taxon 064 strain 2-83 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KU351679.1|](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/1004357335?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=10&RID=FFGC4DXX015)Length: 1524Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 36 to 805[GenBank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/1004357335?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=10&RID=FFGC4DXX015&from=36&to=805)[Graphics](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1004357335?report=graph&rid=FFGC4DXX015%5b1004357335%5d&tracks=%5bkey:sequence_track,name:Sequence,display_name:Sequence,id:STD1,category:Sequence,annots:Sequence,ShowLabel:true%5d%5bkey:gene_model_track,CDSProductFeats:false%5d%5bkey:alignment_track,name:other%20alignments,annots:NG%20Alignments%7CRefseq%20Alignments%7CGnomon%20Alignments%7CUnnamed,shown:false%5d&v=0:843&appname=ncbiblast&link_loc=fromHSP) Next Match Previous Match

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Alignment statistics for match #1 | | | | |
| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
| 1376 bits(745) | 0.0 | 763/771(99%) | 3/771(0%) | Plus/Plus |
|  |  |  |  |  |

Query 8 GTGCCCTATACATGC-AGTAGAACGCTG-AGAGAGGAGCTTGCTCTTCTTGGATGAGTTG 65

||||| |||||||| |||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 36 GTGCCTAATACATGCAAGTAGAACGCTGAAGAGAGGAGCTTGCTCTTCTTGGATGAGTTG 95

Query 66 CGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTGGTAGCGGGGGATAACTATTGGAAACG 125

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 96 CGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTGGTAGCGGGGGATAACTATTGGAAACG 155

Query 126 ATAGCTAATACCGCATAATAGTAGATGTTGCATGACATTTGCTTAAAAGGTGCAATTGCA 185

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 156 ATAGCTAATACCGCATAATAGTAGATGTTGCATGACATTTGCTTAAAAGGTGCAATTGCA 215

Query 186 TCACTACCAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTCACCAAGGC 245

|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||

Sbjct 216 TCACTACCAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC 275

Query 246 AACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG 305

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 276 AACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG 335

Query 306 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGGAAGTCTGACCGAGCAA 365

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 336 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGGAAGTCTGACCGAGCAA 395

Query 366 CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAACGAGT 425

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 396 CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAACGAGT 455

Query 426 GTGAGAGTGGAAAGTTCACACTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGT 485

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 456 GTGAGAGTGGAAAGTTCACACTGTGACGGTATCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGT 515

Query 486 GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGC 545

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 516 GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGC 575

Query 546 GAGCGCAGGCGGTTAGATAAGTCTGAAGTTAAAGGCTGTGGCTTAACCATAGTACGCTTT 605

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 576 GAGCGCAGGCGGTTAGATAAGTCTGAAGTTAAAGGCTGTGGCTTAACCATAGTACGCTTT 635

Query 606 GGAAACTGTTTAACTTGAGTGCAAGAGGGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAAT 665

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 636 GGAAACTGTTTAACTTGAGTGCAAGAGGGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAAT 695

Query 666 GCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCTTGTAACTGACGCT 725

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 696 GCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCTTGTAACTGACGCT 755

Query 726 GACGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTATATACCCTGGTAGCTCCA 776

|| |||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||| ||||

Sbjct 756 GAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG-TCCA 805